

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE  
PROF. DR. HELMFRIED E. KLEIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EIGNUNG VON CYP1A2-GENVARIANTEN ALS  
PRÄDIKTOREN DES SERUMSPIEGELS  
VON OLANZAPIN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vera Wechsung

2009



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE  
PROF. DR. HELMFRIED E. KLEIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EIGNUNG VON CYP1A2-GENVARIANTEN ALS  
PRÄDIKTOREN DES SERUMSPIEGELS  
VON OLANZAPIN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vera Wechsung

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Göran Hajak, M.B.A.

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Norbert Weidner

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2009

Teile der vorliegenden Arbeit waren Gegenstand zu Kongressbeiträgen und veröffentlichter Abstracts:

Sand PG, Wechsung V, Stoertebecker P, Hajak G, Eichhammer P. 2004. In vivo examination of the intronic CYP1A2\*1F variant does not support functional effects of the 'high inducibility' allele on gene expression. *Am J Med Gen (Neuropsychiatr Genet)* 130B:164.

Sand PG, Wechsung V, Störtebecker P, Langguth B, Hajak G, Eichhammer P. 2004. In vivo Untersuchungen des CYP1A2\*1F Polymorphismus sprechen gegen eine funktionelle Relevanz für die Pharmakotherapie. *Nervenarzt* 75 Suppl. 2

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	PHARMAKOGENETIK.....	1
1.2	CYTOCHROM P 450 1A2.....	2
1.2.1	Definition.....	2
1.2.2	Genetische Varianten .....	3
1.3	OLANZAPIN .....	6
1.3.1	Definition, Indikationen, Pharmakokinetik, Nebenwirkungen .....	6
1.3.2	Überwachung der therapeutischen Medikamentendosis („Therapeutic Drug Monitoring“) .....	8
<b>2</b>	<b>ZIELE.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>10</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER STICHPROBE .....	10
3.2	BESTIMMUNG DER SERUM-OLANZAPINKONZENTRATION .....	12
3.3	GENOTYPISIERUNG.....	12
3.3.1	DNA-Isolierung .....	12
3.3.3	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Assay.....	14
	<b>ENZYM.....</b>	<b>15</b>
	<b>ERKENNUNGSSEQUENZ.....</b>	<b>15</b>
	<b>PUFFER .....</b>	<b>15</b>
	<b>CYP1A2- .....</b>	<b>15</b>
	<b>SEQUENZVARIANTE .....</b>	<b>15</b>
	<b>BASEN-AUSTAUSCH.....</b>	<b>15</b>
3.3.4	Agarose-Gel-Elektrophorese .....	15
3.4	REPORTERGENASSAY FÜR DEN CYP1A2*1F-POLYMORPHISMUS .....	16
3.4.1	DNA-Klonierung.....	16
3.4.2	Expressionssystem.....	19
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	24
3.5.1	Wahrung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium in der untersuchten Stichprobe .....	24
3.5.2	Kolmogorov-Smirnov-Test .....	25
3.5.3	t-Test für unabhängige und für gepaarte Stichproben .....	25
3.5.4	Regressionsanalyse.....	25
3.5.5	Haplotypanalyse .....	26
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
4.1	OLANZAPINSERUMSPIEGEL.....	27
4.1.1	Therapeutischer Bereich .....	28
4.1.2	Serumspiegel nach Geschlecht .....	28
4.1.4	Serumspiegel bei Patienten verschiedener Altersgruppen .....	29
4.1.5	Serumspiegel bei Patienten mit Nikotinabusus .....	30
4.1.6	Serumspiegel bei Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen.....	32
4.1.7	Serumspiegel bei Patienten unter Komedikation.....	33
4.2	CYP1A2F21L-VARIANTE .....	36
4.2.1	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen.....	36
4.2.2	Olanzapinspiegel.....	36

4.3	CYP1A2*1F-POLYMORPHISMUS .....	36
4.3.1	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen.....	36
4.3.2	Olanzapinspiegel.....	37
4.3.3	Funktionelle Charakterisierung des CYP1A2*1F-Polymorphismus im Zellmodell.....	38
4.4	rs2069519-POLYMORPHISMUS .....	39
4.4.1	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen.....	39
4.4.2	Olanzapinspiegel.....	40
4.5	EINFLUSS VON MEHREREN DESKRIPTOREN AUF DEN SERUMSPIEGEL UND AUF NEBENWIRKUNGEN VON OLANZAPIN .....	41
4.6	HAPLOTYPEN.....	43
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>44</b>
5.1	SERUMSPIEGEL VON OLANZAPIN.....	44
5.1.1	Bezug zum therapeutischen Bereich.....	44
5.1.2	Prädiktoren des Olanzapinspiegels.....	45
5.1.3	Interaktionsmodelle .....	47
5.2	EINFLUSS VON CYTOCHROM P450 1A2- POLYMORPHISMEN AUF DEN OLANZAPIN- METABOLISMUS .....	47
5.2.1	CYP1A2F21L-Variante .....	48
5.2.2	CYP1A2*1F (rs762551) -Polymorphismus .....	48
5.2.3	rs2069519-Polymorphismus.....	50
5.3	HAPLOTYPEN.....	51
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>60</b>
8.1	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	60
8.1.1	Tabellenverzeichnis.....	60
8.1.2	Abbildungsverzeichnis.....	60
8.2	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE .....	61
8.2.1	Verbrauchsmittel .....	61
8.2.2	Lösungen .....	62
8.2.5	Medien.....	63
8.2.8	gebrauchsfertige Reaktionskits.....	63
8.2.3	Bakterien.....	64
8.2.4	Eukaryontische Zellen .....	64
8.2.7	Reaktionsgefäße.....	64
8.2.6	Geräte.....	64
8.2.9	Software.....	64

# 1 Einleitung

## 1.1 Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit genetisch bedingten interindividuellen Unterschieden in der Wirkung von Medikamenten. Diese können durch erbliche Veränderungen in Struktur oder Expression von Rezeptoren, Transportproteinen und Enzymen des Arzneimittel-Stoffwechsels hervorgerufen werden. Pharmakogenetische Effekte wurden erstmals bei dem Muskelrelaxans Suxamethonium beobachtet. Durch eine aktivitätsgeminderte Variante des Enzyms Pseudocholinesterase wird der Abbau des Medikaments verzögert und somit die Wirkdauer verlängert (Liddell, 1968).

Genetische Varianten sind Unterschiede in der DNA-Sequenz, die einzelne Basen betreffen können (Single nucleotide polymorphism, SNP). Der Austausch einer oder mehrerer Basen (Adenosin, Guanin, Tyrosin oder Cytosin) kann die Gentranskription beeinflussen oder bei der Translation in das Protein zu einer Änderung der Aminosäurenstruktur führen. Deletions- bzw. Insertionspolymorphismen zeichnen sich durch den Wegfall oder Einbau eines oder mehrerer Nukleotide aus.

Je nach Häufigkeit des Auftretens in der Bevölkerung spricht man bei genetischen Varianten von 'Polymorphismus' (Prävalenz mehr als ein Prozent) oder 'Mutation' (Prävalenz weniger oder gleich 1%).

Das Ziel der Pharmakogenetik ist, den Erfolg einer Pharmakotherapie vorauszusagen und deren Nebenwirkungen zu minimieren. Einen Beitrag dazu leisten Daten des HumanGenomProjekts (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) zu zahlreichen Polymorphismen von Transport- und Rezeptorproteinen sowie Enzymen des Arzneimittel-Metabolismus (Liggett, 2001). Insgesamt wird inzwischen davon ausgegangen, dass mehr als 3 Millionen SNPs über das menschliche Genom verteilt sind, deren pharmakologische Funktionalität es in vielen Fällen näher zu erforschen gilt.

Im Fokus dieser Bemühungen stehen insbesondere Varianten, die Enzyme der Cytochrom-P(CYP)-450-Familie betreffen. Sie sind u.a. in der Leber am Metabolismus vieler Arzneimittel beteiligt und für deren Toxizität mitbestimmend.

Für einige dieser Enzyme wurden in den letzten Jahren Schnelltests entwickelt, mit denen bestimmte Polymorphismen identifiziert werden können. Hierzu zählt der AmpliChipCYP450®-Test der Firma Roche für Genvarianten der Isoenzyme CYP2C19 und CYP2D6 (Piper, 2004). Aktuelle Kenntnisse über das Cytochrom-P-450-Enzymsystem und die Charakteristika der Isoenzyme und ihrer Varianten sind in verschiedenen Online-Datenbanken gesammelt. Aufzuführen ist hier Online Mendelian Inheritance in Man® (OMIM, [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)), eine von Victor McKusick initiierte Datenbank des National Center for Biotechnology Information der USA, die umfangreiche Informationen über die Gene des Menschen und deren Mutationen enthält. Ebenfalls abrufbar sind dort Angaben zu klinischen Symptomen, Erbgang, Molekulargenetik und wissenschaftlichen Publikationen (Hamosh et al., 2000). Weitere Details zu CYP-Genvarianten bietet die Internetseite [www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se) des Karolinska Instituts in Stockholm.



## 1.2 Cytochrom P 450 1A2

### 1.2.1 Definition

Die Enzymfamilie der Cytochrome P450 (kurz CYP450) gehört zu einer Gruppe von Hämproteinen, die u.a. in der Leber als Katalysatoren der Phase-I-Reaktionen den Metabolismus von Medikamenten steuern. Der Bezeichnung 'Cytochrom' liegt die Eigenschaft zugrunde, im Komplex mit Kohlenmonoxid Licht zu absorbieren, wobei 'P' für Pigment steht und '450' die Wellenlänge in nm angibt. Derzeit sind ca. 25 Isoenzyme bekannt, die in 20 Subfamilien und 14 Familien klassifiziert sind. Die Nomenklatur folgte ursprünglich der Substratspezifität. 1987 wurde eine neue Klassifizierung eingeführt, die auf der Homologie der Aminosäuresequenz basiert (Nebert et al., 1987). Danach setzt sich die Bezeichnung der Isoenzyme (z.B. CYP1A2) zusammen aus einer Zahl, die die Genfamilie definiert, innerhalb derer mindestens 40% der Aminosäuresequenz übereinstimmt. Dieser Zahl folgt ein Großbuchstabe, der die Subfamilie bezeichnet, für die mindestens 55% der Aminosäurefolge identisch sein muss. Die zweite Zahl steht für das jeweilige Isoenzym (Slaughter et al., 1995).

Das Cytochrom P 450 1A2 ist eine so genannte mischfunktionelle Monooxygenase (nur ein Sauerstoffatom wird auf das Substrat übertragen), die polyaromatische Kohlenwasserstoffe wie Steroide, Fettsäuren und Medikamente metabolisiert. Der  $\text{Fe}^{3+}$ -Häm-Komplex wird durch ein Elektron reduziert, das einer Transfer-Kette mit NADPH-Flavoprotein entstammt. Durch die Bindung eines  $\text{O}_2$ -Moleküls und die Aufnahme eines weiteren Elektrons kann das Substrat als oxygenierter Metabolit abgespalten werden. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

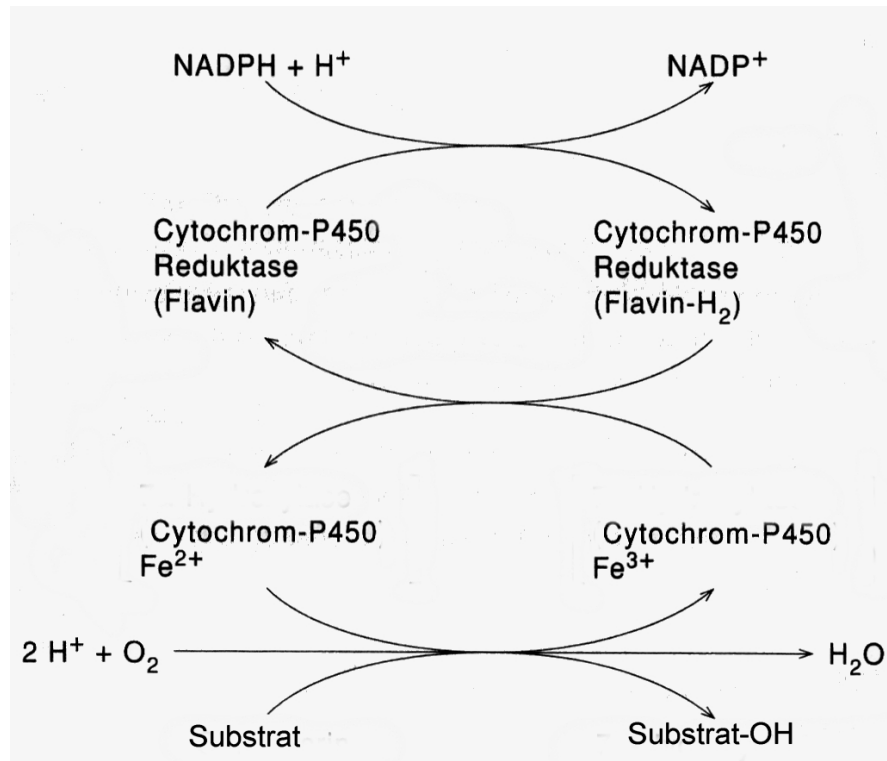


Abbildung 1: Hydroxylierung eines Substrats durch das Cytochrom P450 (s. Zubay, 2000)

Das CYP1A2-Isoenzym stellt bis zu 13% aller in der Leber vorhandenen Cytochrome (Papp-Jambor et al., 2002). Zu seinen Substraten zählen etliche im klinischen Alltag gebräuchliche Medikamente, einschließlich Neuroleptika wie Olanzapin (Rao et al., 2001) und anderer Psychopharmaka. Einige dieser Substanzen besitzen die Eigenschaft, die Aktivität des Enzyms induzieren oder inhibieren zu können. Zu ersteren werden die Medikamente Omeprazol (Frick et al., 2003) und Carbamazepin (Lucas et al., 1998) gerechnet, neben Genussmitteln wie Nikotin (Parsons et al., 1978), verschiedenen Nahrungsmitteln (Fontana et al., 1999), aber auch körpereigenen Stoffen, z.B. Insulin (Barnett et al., 1992). Zur Gruppe der Inhibitoren des Enzyms zählen zum Beispiel orale Kontrazeptiva, Antiarrhythmika, selektive Serotonin-Aufnahme-Hemmer, H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten ebenso wie Chinolon-Antibiotika (Flockhart, 2007).

### 1.2.2 Genetische Varianten

Auswirkungen von Genvarianten der Cytochrom-P-450-Familie können für die Metabolisierung einer großen Zahl verschiedener Medikamente und Nahrungsbestandteile in der Leber bedeutsam sein. Eine Veränderung in diesen Genen kann funktionelle Konsequenzen für den Stoffwechsel dieser Substrate bedingen. Es kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung der Enzymaktivität sowie ein kompletter Funktionsausfall auftreten. Man unterscheidet die Phänotypen *poor metabolizer* (schwache Aktivität), *extensive metabolizer* (normale Aktivität), und (*ultra-*) *rapid metabolizer* (verstärkte Enzymaktivität). Hierbei handelt es sich nicht um absolute Kategorien. Man orientiert sich vielmehr an einer populationspezifischen Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme. (Papp-Jámboer et al., 2002 )

Abweichungen in der Aktivität der Proteine können auf einer veränderten Enzymstruktur beruhen, die durch Austausch von Aminosäuren hervorgerufen wird. Dies wird durch Veränderungen der Nukleotidabfolge im kodierenden Bereich der Gen-Sequenz des Enzyms bewirkt. Für das Isoenzym CYP1A2 kodiert ein Gen auf Chromosom 15q22-q24. Es erstreckt sich über 7,78kb und enthält 7 Exons (Ikeya et al., 1989). Seit der Veröffentlichung der Basensequenz des Gens wurde eine Vielzahl von Varianten beschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden der von Aitchison et al. (2000) entdeckte Polymorphismus rs2069519 und die Variante CYP1A2 F21L (rs28399432, Huang et al., 1999) sowie der von Sachse et al. (1999) und Chida et al. (1999) beschriebene Polymorphismus CYP1A2\*1F (rs762551) auf ihre Häufigkeit untersucht. Letzterer wurde zudem mittels eines Zellmodells auf seine Funktionalität geprüft. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die derzeit bekannten Polymorphismen.

Nur wenige der aufgeführten Sequenzvarianten des CYP1A2-Gens wurden bisher funktionell untersucht. So beschrieben Chevalier et al. (2001) und Zhou et al. (2004) das Allel CYP1A2\*3, bei dem ein Basentausch von Guanin zu Adenosin den Austausch einer Aminosäure (Asparagin für Aspartat) zur Folge hat. Daraus resultiert eine verminderte Expression des Enzyms und ein verlangsamter Metabolismus. Ähnlich wirkt sich ein Basentausch von Adenosin und Tyrosin aus, wodurch für Isoleucin Phenylalanin in die Proteinkette eingebaut wird (CYP1A2\*4, Chevalier et al., 2001, Zhou et al., 2004). Zu einer verminderten Enzymaktivität durch eine Variation der Proteinstruktur kann es auch durch Spleißdefekte kommen, so bei Trägern des Allels CYP1A2\*7 (Allorge et al., 2003). Eine gesteigerte Enzymexpression dagegen wird dem von Sachse et al. 1999 beschriebenen CYP1A2\*1F-Allel zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird dieser Sachverhalt im Zellmodell näher untersucht.

**Tabelle 1: Genvarianten und assoziierte Phänotypen des Cytochrom-P450-1A2-Gens**  
(s. [www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm))

Allele bzw. Haplotypen	Protein	Basentausch	Änderung der Aminosäuresequenz	Enzymaktivität		Referenz
				In vivo	In vitro	
CYP1A2*1A	CYP1A2.1	keiner (Wildtyp)		normal	normal	Ikeya <i>et al.</i> , 1989 Quattrochi und Tukey, 1989
CYP1A2*1B	CYP1A2.1	5347T>C				Nakajima <i>et al.</i> , 1994 Welfare <i>et al.</i> , 1999
CYP1A2*1C	CYP1A2.1	<b>-3860G&gt;A</b>		vermindert		Nakajima <i>et al.</i> , 1999
CYP1A2*1D	CYP1A2.1	-2467delT				Chida <i>et al.</i> , 1999
CYP1A2*1E	CYP1A2.1	-739T>G				Chida <i>et al.</i> , 1999
CYP1A2*1F	CYP1A2.1	<b>-163C&gt;A</b>		höhere Induzierbarkeit		Sachse <i>et al.</i> , 1999 Chida <i>et al.</i> , 1999 Han <i>et al.</i> , 2002
CYP1A2*1G	CYP1A2.1	-739T>G; 5347T>C				Chevalier <i>et al.</i> , 2001
CYP1A2*1H	CYP1A2.1	2025A>C; 5347T>C				Chevalier <i>et al.</i> , 2001
CYP1A2*1J	CYP1A2.1	-739T>G ; <b>-163C&gt;A</b>				Aklillu <i>et al.</i> , 2003
CYP1A2*1K	CYP1A2.1	-739T>G; <b>-729C&gt;T</b> ; <b>-163C&gt;A</b>		vermindert		Aklillu <i>et al.</i> , 2003
CYP1A2*1L Haplotyp	CYP1A2.1	-3860G>A; -2467delT; <b>-163C&gt;A</b> ; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1M Haplotyp	CYP1A2.1	<b>-163C&gt;A</b> ; 2159G>A				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1N Haplotyp	CYP1A2.1	-3594T>G; -2467delT; <b>-163C&gt;A</b> ; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1P Haplotyp	CYP1A2.1	-3594T>G; -2467delT; -733G>C; <b>-163C&gt;A</b> ; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1Q Haplotyp	CYP1A2.1	-2808A>C; <b>-163C&gt;A</b> ; 2159G>A				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1R Haplotyp	CYP1A2.1	-3594T>G; -2467delT; -367C>T; <b>-163C&gt;A</b> ; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1S Haplotyp	CYP1A2.1	-3053A>G; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1T Haplotyp	CYP1A2.1	-2667T>G; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1U Haplotyp	CYP1A2.1	678C>T; 5347T>C				Soyama <i>et al.</i> , 2005
CYP1A2*1V Haplotyp	CYP1A2.1	-2467delT; <b>-163C&gt;A</b>				Ghotbi <i>et al.</i> , 2007

<i>CYP1A2*1W Haplotyp</i>	CYP1A2.1	-3113A>G; -2467delT; -739T>G; <b>-163C&gt;A</b>				Ghotbi <i>et al.</i> , 2007
<i>CYP1A2*2</i>	CYP1A2.2	63C>G	F21L			Huang <i>et al.</i> , 1999
<i>CYP1A2*3</i>	CYP1A2.3	<b>2385G&gt;A</b> ; 5347T>C	<b>D348N</b>	verminderte Expression		Chevalier <i>et al.</i> , 2001 Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*4</i>	CYP1A2.4	<b>2499A&gt;T</b>	<b>I386F</b>	verminderte Expression		Chevalier <i>et al.</i> , 2001 Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*5</i>	CYP1A2.5	3497G>A	C406Y			Chevalier <i>et al.</i> , 2001
<i>CYP1A2*6</i>	CYP1A2.6	5090C>T	R431W	verminderte Expression		Chevalier <i>et al.</i> , 2001 Zhou <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*7</i>		<b>3534G&gt;A</b>	<b>Spleißdefekt</b>	vermindert		Allorge <i>et al.</i> , 2003
<i>CYP1A2*8</i>	CYP1A2.8	<b>5166G&gt;A</b> ; <b>5347T&gt;C</b>	<b>R456H</b>		vermindert	Soyama <i>et al.</i> , 2005 Saito <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP1A2*9</i>	CYP1A2.9	248C>T	T83M			Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*10</i>	CYP1A2.10	502G>C	E168Q			Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*11</i>	CYP1A2.11	<b>558C&gt;A</b>	<b>F186L</b>		vermindert	Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*12</i>	CYP1A2.12	634A>T	S212C			Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*13</i>	CYP1A2.13	1514G>A	G299S			Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*14</i>	CYP1A2.14	5112C>T	T438I			Murayama <i>et al.</i> , 2004
<i>CYP1A2*15</i>	CYP1A2.15	<b>125C&gt;G</b> ; <b>5347T&gt;C</b>	<b>P42R</b>		vermindert	Soyama <i>et al.</i> , 2005 Saito <i>et al.</i> , 2005
<i>CYP1A2*16</i>	CYP1A2.16	<b>2473G&gt;A</b> ; <b>5347T&gt;C</b>	<b>R377Q</b>		vermindert	Soyama <i>et al.</i> , 2005 Saito <i>et al.</i> , 2005
		-1051T>C; -733G>C; 1590C>T; 2570G>A; 2646C>T; 2694A>C; 5010C>T; 5521A>G				Solus <i>et al.</i> , 2004
		53C>G	S18C			Solus <i>et al.</i> , 2004
		1513C>A	S298R			Solus <i>et al.</i> , 2004
		1559A>G	I314V			Solus <i>et al.</i> , 2004
Die Funktionalität fett gedruckter Nukleotidabweichungen ist nach Ansicht der Autoren gesichert						

## 1.3 Olanzapin

### 1.3.1 Definition, Indikationen, Pharmakokinetik, Nebenwirkungen

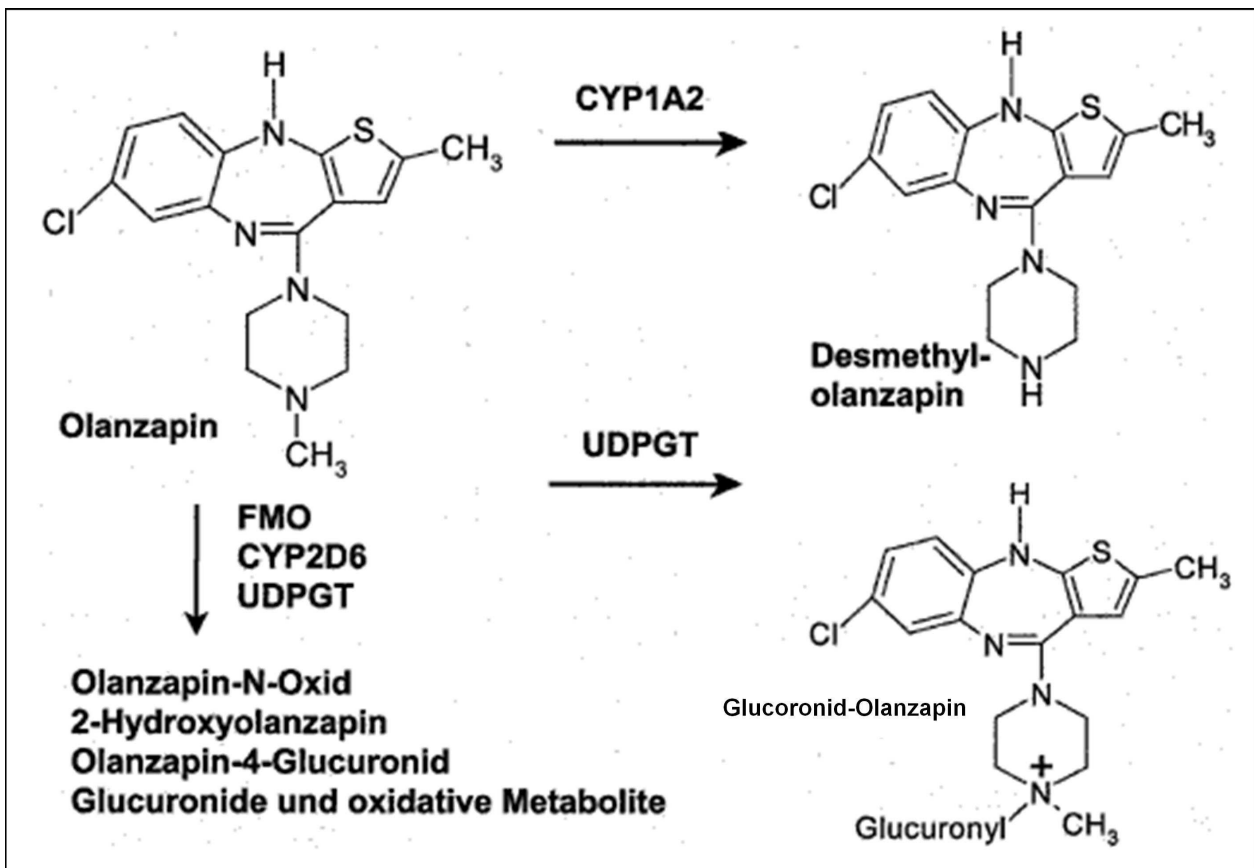
Olanzapin wird zu den so genannten ‘atypischen’ Neuroleptika der Thiobenzodiazepingruppe gezählt. Als Weiterentwicklung von Clozapin dient es zur Behandlung von schizophrenen Störungen und erhielt 1996 die Zulassung auf dem europäischen Markt. 2002 wurde die Indikation auf die Therapie bipolarer affektiver Störungen und manischer Episoden erweitert. ‘Atypische’ Neuroleptika zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Vergleich zu den ‘klassischen’ Neuroleptika, wie etwa Haloperidol, weniger extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen und insbesondere weniger Spätdyskinesien hervorrufen (Buckley, 2005).

Die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika fußt auf einer Blockade postsynaptischer Dopamin (D)- und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) – Rezeptoren, wobei eine Affinität zu D<sub>2</sub>-Rezeptoren mit dem Auftreten von extrapyramidalmotorischen Nebenwirkungen in Zusammenhang gebracht wird. Demgegenüber zeichnet sich Olanzapin durch eine hohe Affinität zu D<sub>4</sub>- und 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren aus (Kapur et al., 1999). Es wird vermutet, dass das Medikament darüber hinaus durch verschiedene Mechanismen neuroprotektiv bzw. fördernd auf die Neurogenese wirkt (Wakade et al., 2002, Kodama et al., 2004). Dem werden auch die positiven Wirkungen auf die kognitiven Fähigkeiten der Patienten zugeschrieben. Im Gegensatz zu Neuroleptika der ersten Generation, die teilweise im Verdacht stehen, neurotoxische Wirkkomponenten aufzuweisen (Bartzokis et al., 2003), ist Olanzapin diesbezüglich zur Langzeittherapie gut geeignet. Seit 2004 sind auch Präparate zur intramuskulären Injektion sowie Lingualtabletten auf dem Markt, die zur Therapie akuter psychotischer Zustände eingesetzt werden.

Olanzapin wird in Dosierungen von 5 bis 20 mg/d per os verabreicht. Circa 5,1 Stunden nach oraler Einnahme wird die maximale Serumkonzentration erreicht, die orale Verfügbarkeit liegt bei 60%. Das Medikament besitzt eine vergleichsweise lange Halbwertszeit von etwa 30 Stunden (Buckley, 2005). Olanzapin wird nur zu ca. 7% unverändert ausgeschieden. Der Metabolismus erfolgt primär über die Leber (Ring et al., 1996) durch CYP1A2 zu 4'-N-Desmethylolanzapin und 7-OH-Olanzapin bzw. durch die Flavinmonooxygenase 3 zu Olanzapin-N-Oxid. Der Abbau über CYP2D6 zu 2-Hydroxyolanzapin spielt nur eine geringe Rolle. Olanzapin wird überwiegend als 4'-N-Desmethylolanzapin ausgeschieden (Callaghan et al., 1999) (Abbildung 2).

Der Serumspiegel im Fließgleichgewicht wird im Durchschnitt nach einer Woche erreicht (Rao et al., 2001). Die Pharmakokinetik des Medikaments wird durch Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Komedikation u.a. mit Carbamazepin, trizyklischen Antidepressiva und Phenothiazin-Neuroleptika beeinflusst (Rao et al., 2001). Bei der Suche nach den determinierenden Einflussgrößen für die unterschiedlich schnelle Metabolisierung des Olanzapin wurden u. a. ethnische Besonderheiten geprüft, ihre Bedeutung soll jedoch eher gering sein (Sathirakul et al., 2003).

In der Literatur finden sich keine einheitlichen Empfehlungen zum optimalen Wirkspiegel. Es werden sowohl eng gefasste Referenzbereiche von 9-23 ng/ml (Ereshefsky et al., 1996), aber auch breitere Bereiche von 5-75 ng/ml (Xue et al., 1998) angegeben. Werte im mittleren Bereich (20-40 ng/ml) werden von Rao et al. (2001) genannt. Letztere scheinen den optimalen therapeutischen Bereich darzustellen, da bei Spiegel unter 20ng/ml eine schlechtere Response zu erwarten ist (Perry et al., 2001) und bei Spiegel, die 40 ng/ml überschreiten, gehäuft extrapyramidalmotorische Störungen zu beobachten waren (Rao et al., 2001). In klinischen Studien zeigte sich, dass die Serumspiegel selten Werte über 150ng/ml erreichen (Lilly pharmaceuticals, 1996), wobei erhebliche intraindividuelle Schwankungen im Metabolismus bis zu 92% beschrieben wurden (Aravagiri et al., 1997).



**Abbildung 2: Übersicht zum Olanzapinmetabolismus: Beteiligte Enzyme: Cytochrome 1A2 bzw. 2D6, Flavinmonooxygenase (FMO) und UDP-Glucuronyltransferase (UDPGT) (s. Rao et al., 2001)**

Es wird diskutiert, ob bereits ab 80ng/ml toxische Wirkungen zu erwarten sind. Chue und Singer (2003) berichten in einem Übersichtsartikel von 29 Todesfällen mit direktem Bezug zu Olanzapinintoxikationen in Kanada im Zeitraum von 1996 bis 2001. Es handelte sich dabei um akzidentelle und um intendierte Überdosierungen mit Olanzapinplasmaspiegeln zwischen 25 ng/ml und 4800 ng/ml.

Als Nebenwirkungen von Olanzapin werden u. a. Schläfrigkeit, akute extrapyramidale Bewegungsstörungen, ein Anstieg der Serumprolaktinkonzentration mit Amenorrhoe, Galaktorrhoe und sexuellen Funktionsstörungen, Kardiotoxizität, Leuko- und Thrombozytopenie beschrieben (Rao et al., 2001). Eine weitere, belastende unerwünschte Wirkung ist die Gewichtszunahme von durchschnittlich 4,2kg in den ersten 36 Wochen der Therapie (Allison et al., 1999).

Die Ergebnisse einer Vergleichsstudie (CATIE-Studie) zwischen neueren 'atypischen' Neuroleptika wie Olanzapin, Risperidon u. a. zeigen, dass die Compliance der Patienten durch das häufige Auftreten dieser Nebenwirkungen in hohem Maße beeinflusst wird. So setzten 64% der Patienten, die an der CATIE-Studie teilnahmen, die Olanzapin-Medikation vor allem wegen einer Gewichtszunahme vorzeitig wieder ab (Lieberman et. al., 2005).

Auf Grund von Studien, die eine Überlegenheit der so genannten 'atypischen' Neuroleptika gegenüber konventionellen Neuroleptika wie Haloperidol in Frage stellen, wird zunehmend diskutiert, ob höhere Therapiekosten für 'atypische' Wirkstoffe gerechtfertigt sind (Rosenheck et al., 2003). In diese Diskussion müssen jedoch methodische Aspekte beim Vergleich von Wirkstoffen einfließen (Buckley, 2005). Durch eine relativ geringe Affinität

des Olanzapin zu den P450–Cytochromen soll es während der Einnahme von Olanzapin relativ selten zu Interaktionen mit anderen Arzneimitteln kommen. (Chong und Remington, 1999). In diesem Zusammenhang wurden u. a. eine Inhibition des Olanzapinmetabolismus bei Kombination mit Fluvoxamin und anderen selektiven Serotonin-Aufnahme-Hemmern beschrieben (Jeppesen et al., 1996), deren Mechanismus in einer kompetitiven Hemmung des Enzyms vermutet wird (Chue und Singer, 2003). Berichtet wird auch von einer Beschleunigung des Olanzapinmetabolismus über eine Induktion von CYP1A2 durch Carbamazepin (Parker et al., 1998).

### **1.3.2 Überwachung der therapeutischen Medikamentendosis („Therapeutic Drug Monitoring“)**

Der komplexe Einfluss von (Ko-)Medikation erschwert vielfach das Erreichen des optimalen Serumspiegels in der Pharmakotherapie. Das so genannte Therapeutic Drug Monitoring (TDM) entspricht einer Phänotypisierung durch wiederholte Bestimmungen der Medikamentenkonzentration im Serum. Es dient dazu, festzustellen, welcher Metabolisierergruppe (langsam, normal oder schnell) der Patient zuzuordnen ist und hilft, die Medikamentendosis dementsprechend abzustimmen. In einer Studie an 250 Patienten zeigte sich, dass der Einsatz von TDM unter einer Olanzapintherapie gerechtfertigt ist auf Grund von Schwankungen im Metabolismus, die auf häufige Einflussgrößen zurückgehen (Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Komedikation) (Gex-Fabry et al., 2003). Meist beschränkt sich die Bestimmung des Metabolisiererstatus auf einen Stoffwechseltest in Form einer Koffein-Challenge. In zunehmendem Maße wird jedoch die Genotypisierung bezüglich relevanter Polymorphismen, wie z.B. bei CYP2D6, als sinnvolle Ergänzung im Rahmen des TDM betrachtet (Dahl, 2002). Auf lange Sicht wird bereits erwogen, das konventionelle TDM durch Gendiagnostik zu ersetzen. Angestrebt wird eine Genotypisierung vor der Therapie mit Medikamenten, die eine geringe therapeutische Breite besitzen, um einen schnelleren Therapieerfolg erzielen zu können. Auch für multimorbide Patienten mit komplexen Medikamentenkombinationen, die das Risiko schwerwiegender Interaktionen bergen, könnte TDM abgelöst werden (Smoller, 2006). Mittlerweile werden Kits angeboten, mit denen im Schnelltest eine Genotypisierung durchgeführt werden kann (z.B. AmpliChip® CYP450 Test der Firma Roche). Informationen zur Medikamentendosierung bei Patienten mit unterschiedlichen Genotypen können schon heute erfragt werden (z.B. [www.drugprofiler.com](http://www.drugprofiler.com)). Die Aussagekraft der Genotypisierung als Prädiktor von Medikamentenspiegeln erschließt sich jedoch erst nach einer differenzierten Betrachtung aller bekannten Einflussgrößen.

## **2 Ziele**

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung definierter Genvarianten des Cytochrom P450 1A2 als Prädiktoren des Olanzapinserumspiegels zu ermitteln. Hierzu sollte die Verteilung von Genvarianten zu den gemessenen Serumspiegeln in Relation gesetzt werden und die Funktionalität der meist typisierten Variante im Zellmodell untersucht werden.

Darüber hinaus sollten Zusammenhänge zwischen CYP1A2-Genotyp und dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen geprüft werden.

Schließlich war unter Berücksichtigung bereits bekannter Einflussgrößen auf den Olanzapinspiegel ein Modell zu entwickeln, das die beobachtete Varianz der Serumspiegel bestmöglich erklärt.



### 3 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurde in einem ersten Schritt aus Blutproben einer Stichprobe schizophrener Patienten DNA isoliert und in einheitlicher Konzentration aliquotiert.

Diese wurde in einem zweiten Schritt verwendet, um das Vorkommen ausgewählter *CYP1A2*-Genvarianten zu bestimmen. Hierzu dienten PCR und Agarose-Gel-Elektrophorese sowie Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Assays. Die Ergebnisse wurden zu den bereits im Vorfeld gemessenen Olanzapinserumspiegeln der jeweiligen Patienten in Beziehung gesetzt.

In einem dritten Schritt wurden *CYP1A2*-Genvarianten kloniert und im Zellmodell anhand eines Reporterassays funktionell charakterisiert.

Schließlich wurde die Wechselwirkung zwischen *CYP1A2*-Genvarianten und anderen Einflussfaktoren auf den Olanzapinmetabolismus in einem Interaktionsmodell untersucht.

#### 3.1 Charakterisierung der Stichprobe

Die untersuchte Stichprobe setzt sich zusammen aus Patienten, die unter der Diagnose einer schizophrenen Psychose (ICD-10: F20.-) zwischen Dezember 1999 und März 2002 in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der Universität Regensburg (Bezirksklinikum) stationär oder ambulant behandelt wurden. Alle Patienten hatten zur Zeit der Blutentnahme eine orale Olanzapindosis zwischen 2,5 und 30 mg/d erhalten.

Von ursprünglich 270 Blutproben entfielen 125 Proben wegen Mehrfachbestimmungen bei einzelnen Patienten bzw. wegen unzureichender Angaben. Damit umfasst die ausgewertete Stichprobe 145 Proben.

Zusätzlich zur Olanzapindosis wurden mittels eines strukturierten Fragebogens, der den behandelnden Ärzten ausgehändigt wurde, folgende Daten der Patienten erhoben: Geschlecht, Alter, Raucherstatus, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen (UAW) und Komedikation. Diese Angaben wurden ergänzt durch den zum Zeitpunkt der Blutabnahme gemessenen Olanzapinserumspiegel. Bei unvollständigen Angaben wurden die Patientenakten des Bezirksklinikums Regensburg zur Verifizierung herangezogen. Die Komedikation wurde in Cytochrom-P450 inhibierende und induzierende Wirkstoffe aufgeteilt (Flockhart, 2007). Die Medikamenteneinnahme wurde nicht überwacht, so dass zur Compliance einzelner Patienten keine Informationen vorliegen. Einen Überblick über die Stichprobe gibt Tabelle 2.

Da es in der Literatur Hinweise gibt, dass bei älteren Patienten höhere Olanzapinspiegel gemessen werden, wurde die Stichprobe dichotomisiert. Die Einteilung erfolgte wie bei Gex-Fabry (2003) in eine Gruppe von Patienten einschließlich 59 Jahre und eine Gruppe ab 60 Jahren.

Alle Patienten hatten im Vorfeld ihr Einverständnis mit den geplanten Untersuchungen erklärt.

**Tabelle 2: Patientenmerkmale**

	Anzahl (Gesamt:N=145)	Prozent
<b>Geschlecht</b>		
Weiblich	63	43,4
Männlich	82	56,6
<b>Alter</b>		
<60 J.	131	90,3
≥60 J.	14	9,7
<b>Raucher</b>		
Ja	51	35,2
Nein	79	54,5
Ohne Angaben	15	10,3
<b>UAW (unerwünschte Arzneimittelwirkungen)</b>		
Ja	8	5,5
Nein	118	81,4
Ohne Angaben	19	13,1
<b>Zusatzmedikation (Psychopharmaka)</b>		
<i>'Mood stabilizer'</i>		
Lithium	18	12,4
Valproinsäure, Lamotrigin, Carbamazepin	25	17,2
<i>Phenothiazine</i>		
Promethazin	10	6,9
Fluphenazin	4	2,8
Thioridazin	4	2,8
Levomepromazin	13	9,0
<i>Andere Neuroleptika</i>		
Risperidon	3	2,1
Haloperidol	11	7,6
Melperon	5	3,4
<i>Benzodiazepine</i>		
Diazepam	3	2,1
Lorazepam	19	13,1
Dikaliumchlorazepat	2	1,4
Clonazepam	1	0,7
Oxazepam	1	0,7
Zotepin, Zopiclon, Zolpidem	6	4,1
<i>Biperiden</i>	10	6,9
<i>SSRI (Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren)</i>		
Citalopram	4	2,8
Fluoxetin	1	0,7
Mirtazapin	1	0,7
Sertralin	3	2,1
Paroxetin	7	4,8
<i>Trizyklische Antidepressiva</i>		
Imipramin	1	0,7
Amitriptylin	6	4,1
Trimipramin	1	0,7
Opipramol	1	0,7
Doxepin	7	4,8
<b>Sonstige Medikation (nicht psychotrop)</b>		
Ja	57	39,3
Nein	53	36,6
Ohne Angaben	1	0,7

### 3.2 Bestimmung der Serum-Olanzapinkonzentration

Die Konzentration von Olanzapin unter steady-state-Bedingungen wurde im Vorfeld der genetischen Untersuchungen bestimmt und basiert auf der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Auftrennung (HPLC) der Serumproben. (Haen et al., 2000)

Die Serumproben wurden hierzu über SEP-PAK-C<sub>18</sub>-Kartuschen vorgereinigt. Dann wurden 15µl des Eluates in eine HPLC-Apparatur injiziert. Diese bestand aus einer seriellen Doppelkolbenpumpe Modell P680 (Dionex/Idstein, Deutschland), einem automatischen Probengeber Model GINA 50 (Dionex/Idstein, Deutschland) und einem amperometrischen Detektor Modell INTRO (Antec/Leiden, Niederlande), dessen Potential auf 0,4 Volt gesetzt wurde. Die Probenauftrennung erfolgte über eine ODS-Hypersil-Säule der Firma Thermo (Dreieich, Deutschland) mit den Maßen 125,0x4,6mm, Teilchengröße 3µm und einer Vorsäule aus 5µm-Material. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Ammoniumacetat-Puffer/Acetonitril und Methanol eingesetzt. Das Chromatogramm wurde mit Hilfe der Cromeleon-Software (Dionex /Idstein, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet.

### 3.3 Genotypisierung

#### 3.3.1 DNA-Isolierung

Zur Vorbereitung der Genotypisierung wurde die DNA aus EDTA-Blut der 145 Patienten isoliert (QIAamp DNA Blood Midi bzw. Maxi Kit, Qiagen, Düsseldorf). Die DNA-Konzentration dieser Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt, um Stammlösungen mit einer DNA-Konzentration von 50ng DNA pro 1 µl 1xTE-Puffer herzustellen. Unter Verwendung der Stammlösungen wurden 96-well-Mikrotiterplatten für die Durchführung der anschließenden PCR befüllt.

#### 3.3.2 PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, zu Deutsch Polymerasekettenreaktion) stellt ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten dar. Die PCR wird seit ihrer Entwicklung durch Mullis et al. (1986) für eine Vielzahl von Aufgaben in der Biologie und Medizin herangezogen. So dient sie beispielsweise als diagnostisches Mittel bei Erbkrankheiten, zum Erregernachweis bei Infektionen und in der Forschung zum Klonieren von Genen oder für die Analyse fossiler DNA.

Zur Durchführung einer PCR wird die Ausgangs-DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt (DNA-Matrize) sowie eine hitzebeständige DNA-Polymerase zur Replizierung der DNA (z.B. Taq-Polymerase) mit Mg<sup>2+</sup>-haltigem Reaktionspuffer benötigt. Als Bausteine für den von der DNA-Polymerase zu synthetisierenden DNA-Strang sind die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin erforderlich sowie zwei Primer/Oligonukleotide, die zu der Sequenz am 5'- bzw. am 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementär sind.

Das Prinzip der PCR-Reaktion lässt sich in drei Schritte aufteilen: Zunächst werden die beiden Stränge der DNA-Matrize getrennt mittels Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 90°C (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur auf 50°C - 65°C gesenkt, sodass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern (Annealing), wobei die Temperatur von den verwendeten Oligonukleotiden, insbesondere ihrer Länge und ihrem Gehalt an Guanin und Cytosin abhängig ist. Verwendet wird vielfach eine Guanin-Cytosin-Konzentration zwischen 30 und 70%. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C angehoben. Dadurch erfolgt eine Aktivierung der DNA-Polymerase, die die angelagerten Primer in 5' → 3'-Richtung mit Hilfe der bereitgestellten Nukleotide entsprechend der DNA-Matrize elongiert (Elongation). Bei einer Standard-PCR werden diese drei Schritte ca. 30-mal wiederholt.

### 3.3.2.1 Primerauswahl

Als Vorlage für die Auswahl der Oligonukleotid-Primer dienen die flankierenden Bereiche der DNA-Matrize. Dabei ist jeweils ein Primer komplementär zum Plus- und ein Primer komplementär zum Minus-Strang der doppelsträngigen DNA. Die entsprechenden genomischen Sequenzen des Cytochrom P450-Gens wurden der Gen-Sequenz-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI GenBank®) entnommen. Bei der Auswahl der Primer wurden repetitive Basensequenzen gemieden und genspezifische Sequenzen mit einem GC-Gehalt unter 70 % gewählt.

Alle Primer wurden mit Hilfe des Primer3-Programms ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www\\_slow.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi), Rozen und Skaletsky, 2000, Whitehead Institute, Cambridge, USA,) entworfen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Primersequenzen**

NAME	SEQUENZ
CYP1A2*1F vorwärts	5'-CTG TGA GAG GAT GGG GAC TC-3'
CYP1A2*1F rückwärts	5'-GAA GGG AAC AGA CTG GGA CA-3'
CYP1A2*F21L vorwärts	5'- GCA TCA CAG GCT ATT TGA ACC-3'
CYP1A2*F21L rückwärts	5'- TAG CAG GAG GAT GAG GAA GC-3'
rs2069519 vorwärts	5'-ACC TTC TAT ATT GTA TCC TGT AAT TTA ATT TTT TAA-3'
rs2069519 rückwärts	5'-ACT GTA AAG TTA CTC CTT TCC CAC CTT T-3'

### 3.3.2.2 PCR-Bedingungen

Die Ansätze für die PCR wurden nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Pipettierschema manuell oder mit Hilfe eines Pipettierroboters in 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäße bzw. 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert. Pro Ansatz ergab sich jeweils ein Gesamtvolumen von 25,8µl.

**Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz**

REAGENZ	MENGE
H <sub>2</sub> O	20,80µl
10x Puffer rot	2,50µl
dNTPs	0,50µl
Primer 1	0,25µl
Primer 2	0,25µl
Taq-Polymerase	0,50µl
DNA-Matrize	1,00µl

Nachfolgend ist die Programmierung des Thermocyclers dargestellt (Abbildung 3):

1. Zyklus	initiale		
	Denaturierung	Annealing	Elongation
	5 Minuten	30 Sekunden	30 Sekunden
	95°C	54°C	72°C
2.-40. Zyklus	Denaturierung	Annealing	Elongation
	30 Sekunden	30 Sekunden	30 Sekunden
	95°C	54°C	72°C
41. Zyklus	Denaturierung	Annealing	terminale Elongation
	30 Sekunden	30 Sekunden	10 Minuten
	95°C	54°C	72°C

**Abbildung 3: Standard-PCR-Profil**

Für den Nachweis des Polymorphismus rs2069519 wurden eigene Reaktionsbedingungen gewählt (Abbildung 4):

1. Zyklus	initiale Denaturierung 5 Minuten 95°C	Annealing 30 Sekunden 58°C	Elongation 1 Minute 72°C
2.-40. Zyklus	Denaturierung 30 Sekunden 95°C	Annealing 30 Sekunden 54°C	Elongation 1 Minute 72°C
41. Zyklus	Denaturierung 30 Sekunden 95°C	Annealing 30 Sekunden 54°C	terminale Elongation 7 Minuten 72°C

**Abbildung 4: PCR-Profil für den Nachweis von rs2069519**

### 3.3.3 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Assay

Zur Genotypisierung wurden die Produkte der Polymerasekettenreaktionen mittels Restriktionsendonukleasen (s.u.) verdaut und die Ergebnisse mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese visualisiert.

Das Prinzip des Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Assays beruht auf der Eigenschaft der Endonukleasen, DNA-Moleküle an spezifischen Stellen zerschneiden zu können und so zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten zu führen. Die Längenunterschiede der Fragmente erlauben demnach Rückschlüsse auf Polymorphismen in den Bereichen der DNA, die für Erkennungssequenzen von Endonukleasen kodieren (sog. Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen – RFLP).

#### 3.3.3.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die ursprünglich aus Bakterien stammen und zur Zerstörung zellfremder DNA dienen, die sie anhand von spezifischen Methylierungsmustern von bakterieneigener DNA unterscheiden können. Jede Restriktionsendonuklease hat eine charakteristische Zielsequenz, an der sie die DNA schneidet. Diese Restriktionsstellen bestehen meist aus 4-8 Basenpaaren, die als palindromisch bezeichnet werden, d.h. unabhängig von der Leserichtung die gleiche Information liefern.

Die Restriktionsenzyme für die vorliegende Arbeit wurden ausgehend von der humanen genomischen DNA-Sequenz mittels GeneTool lite, Version 2.0 (BioTools Inc., Edmonton, Kanada) ausgewählt.

#### 3.3.3.2 Restriktionsverdau

Im Folgenden werden die verwendeten Reaktionsbedingungen und Enzyme tabellarisch dargestellt:

**Tabelle 5: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau (Gesamtvolumen 34,8µl bzw. 33,5 µl)**

REAGENZ	VOLUMINA
Enzym (10000U/µl)	0,5µl
Puffer	2,0µl
dH <sub>2</sub> O	7,5µl
PCR-Produkt	23,0µl

**Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen**

ENZYM	ERKENNUNGSSEQUENZ	PUFFER	CYP1A2-SEQUENZVARIANTE	BASEN-AUSTAUSCH
<i>BsuRI</i> ( <i>HaeIII</i> )	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'	MBI R+	CYP1A2*1F	A→C
<i>MboII</i>	5'...GAAGA (N) <sub>8</sub> ↓...3' 3'...CT TCT (N) <sub>7</sub> ↑...5'	MBI R+	CYP1A2 F21L	G→C
<i>DdeI</i>	5'...C↓TNAG...3' 3'...GANT↑C...5'	NEBuffer3	rs2069519	G→T

Die Ansätze wurden jeweils für mindestens drei Stunden bei 37°C inkubiert, die Reaktionsprodukte anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt und photographisch dokumentiert.

### 3.3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

In der Agarose-Gel-Elektrophorese lassen sich einfach und effektiv DNA-Fragmente von 0,1 bis 25kb Länge separieren und analysieren. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Amplifikate in vorgeformte Taschen eines Agarose-Gels eingebracht, das sich in einer Elektrophoresekammer mit geeignetem Puffer befindet. Zur Auftrennung der einzelnen Fragmente wird eine Spannung zwischen 50V und 150V angelegt. Im entstehenden elektrischen Feld entwickeln die einzelnen DNA-Fragmente eine spezifische Wandergeschwindigkeit. Diese ist u. a. abhängig von Größe, Form und Nettoladung der Reaktionsprodukte sowie von pH-Wert und Stromspannung. DNA-Moleküle wandern auf Grund ihrer negativen Ladung von Kathode zu Anode, wobei kleine Fragmente schneller wandern als große Fragmente. Durch das Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes (hier: Ethidiumbromid) in das Gel kann das Ergebnis der Auftrennung nach ausreichend langer Laufzeit unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Größenzuordnung erfolgt mittels eines Größenmarkers.

Für die vorliegende Arbeit wurden 2%ige und 4%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung von 2%igen Gelen wurden je nach gewünschter Größe des Gels (2x12, 2x24 bzw. 2x48 Taschen) 1-3 Vielfache von 2g Agarose in 100ml 1xTAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Nach Einrühren von 5µl Ethidiumbromid pro 100ml wurden diese in Gussformen mit einsetzbaren Kämme gegeben. Nach der Polymerisation erfolgte die Beladung in einer mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Die Taschen des Gels wurden mit 10 bis 20µl des Restriktionsprodukts befüllt. Anschließend wurde für 30-45 Minuten je nach Gelgröße eine Spannung zwischen 70V und 120V angelegt. Die Ergebnisse wurden per UV-Durchlichtaufnahmen der Agarosegele dokumentiert.

Tabelle 7 zeigt die zu erwartenden Fragmentgrößen (bp) der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten CYP1A2-RFLP-Assays.

**Tabelle 7: Fragmentgrößen (bp) der durchgeführten CYP1A2-RFLP-Assays**

<i>BsuRI</i> -Verdau	<i>MboII</i> -Verdau	<i>DdeI</i> -Verdau
493	689	227
302	554	193
191	293	34
111	135	

### 3.4 Reportergenassay für den CYP1A2\*1F-Polymorphismus

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des CYP1A2\*1F-Polymorphismus wurden aus der Stichprobe jeweils fünf Proben mit Genotyp „AA“ und fünf mit Genotyp „CC“ ausgewählt. Bei diesen wurde eine Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt, um das Vorliegen weiterer Polymorphismen auszuschließen. Anhand der Sequenzierungsergebnisse wurden zwei Proben ausgewählt, die sich lediglich für den CYP1A2\*1F-Polymorphismus unterschieden. Diese wurden mittels einer DNA-Klonierung vervielfältigt.

Für die Prüfung der Eigenschaften des CYP1A2\*1F-Polymorphismus wurde als Expressionssystem der Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega Corporation, Madison, USA) verwendet, der mit den Biolumineszenzreaktionen der Feuerfliege *Photinus pyralis* und der Meeresqualle *Renilla reniformis* arbeitet. Mit der Aktivität der Photinus-Luziferase wird dabei in transfizierten Zellen die Expression des zu untersuchenden Genprodukts nachgewiesen, während die Aktivität der Renilla-Luziferase als interner Standard dient. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte in drei verschiedenen Säugetier-Zelllinien. Für die Durchführung dieses Experiments wurde die aus der Klonierung gewonnene Plasmid-DNA der Allele „A“ und „C“ mit dem Luziferase-Gen der Feuerfliege ligiert. Nach Kotransfektion des Ligationsprodukts und des Renilla-Luziferasegens wurde von der relativen Biolumineszenzstärke (Photinus:Renilla) auf den dazu proportionalen regulatorischen Einfluss des CYP1A2\*1F-Polymorphismus geschlossen.

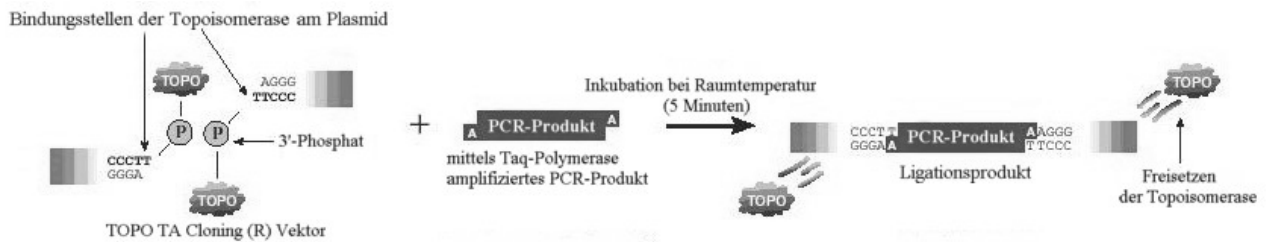
Im Folgenden werden die einzelnen Schritte von der DNA-Klonierung bis zur Quantifizierung der Genexpression näher beschrieben.

#### 3.4.1 DNA-Klonierung

Die DNA-Klonierung erlaubt eine gezielte Anreicherung von DNA-Fragmenten über eine Selektion und Züchtung von transformierten Zellen, die alle ein identisches fremdes DNA-Fragment enthalten. Die Aufnahme fremder DNA in die bakteriellen Wirtszellen (Transformation) erfolgt mittels eines Plasmidvektors (s. u.). Dieser kann sich in einer Zelle autonom replizieren und wird mit der zu vermehrenden Fremd-DNA verbunden. Im vorliegenden Fall sollten Fragmente mit dem „A-Allel“ bzw. dem „C-Allel“ des CYP1A2\*1F-Polymorphismus vermehrt werden. Insgesamt gliedert sich der Klonierungsvorgang demnach in drei Schritte:

1. Ligation der Fremd-DNA mit dem Plasmid,
2. Aufnahme des Plasmidvektors in die Wirtszelle (Transformation)
3. Kolonisierung der Wirtszellen.

Für die hier vorgestellten Experimente wurde das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) verwendet. Dieses basiert auf der Eigenschaft der *Vaccinia* Topoisomerase I, die Schnittstelle (C/T)CCTT am Plasmid zu erkennen und zu schneiden. Daraufhin bleibt sie über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent an das Plasmid gebunden. Wenn das Plasmid ausschließlich mit Fremd-DNA inkubiert wird, die mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert wurde, so verbindet sich deren 3'-Ende (Adenosin) mit dem Thymin der Schnittstelle am Plasmid (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Klonierung von Taq-amplifizierter DNA mit der TOPO TA-Methode (vgl. TOPO Cloning Technology, Invitrogen, 2003)**

### 3.4.1.1 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen als „autonome“, d.h. unabhängig von der Wirts-DNA exprimierfähige, ringförmig angeordnete Elemente vorliegen. Auf ihnen sind bestimmte Eigenschaften kodiert, die dem Bakterium Selektionsvorteile einräumen wie etwa die Resistenz gegen bestimmte Antibiotika. Dies wird bei der Klonierung genutzt: Für die Anzucht der transformierten Bakterien werden die Nährböden mit den entsprechenden Antibiotika angereichert, sodass sich nur Kolonien entwickeln können, die neben dem Resistenzgen auch die Fremd-DNA enthalten.

Für die vorliegende Arbeit wurde das Plasmid pCR®2.1TOPO®-Vektor verwendet. Dieser Vektor besitzt Resistenzgene gegen Kanamycin und Ampicillin, sowie einen T7-Promotor zur Steuerung der *in vitro* Transkription (Abbildung 6).

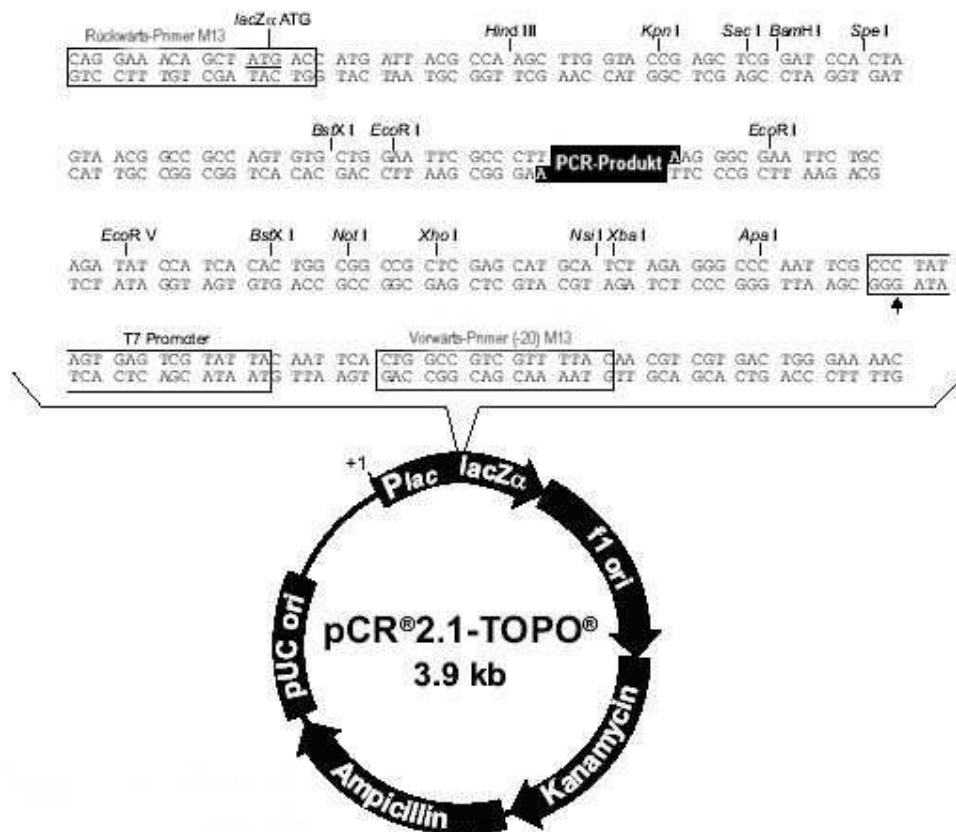
### 3.4.1.2 Wirtszellen

Als Wirtszellen für die Aufnahme von Fremd-DNA eignen sich Bakterien verschiedener Stämme, wobei nicht alle für die Transformation kompetent sind. In der vorliegenden Arbeit wurden gramnegative *Escherichia coli*-Bakterien verwendet, die chemisch vorbehandelt und transformationskompetent gemacht worden waren. Darüber hinaus besitzen viele Wirtszellen zusätzliche Eigenschaften, die den Routine-Gebrauch im Labor einfacher gestalten. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm (*E. coli* K-12-Stamm DH10B) verfügte unter anderem über die so genannte *recA1*-Mutation, die eine Rekombination zwischen Wirtszellgenom und Plasmid unterbindet, so dass die im Plasmid enthaltene Fremd-DNA nicht in das Wirtszellgenom integriert werden kann.

### 3.4.1.3 Klonierung

Für die Klonierung wurde zunächst eine PCR nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Als DNA-Matrizen dienten die zuvor genotypisierten Proben Ola-518 (Genotyp AA) und Ola-572 (Genotyp CC). Um kompatible Schnittstellen für die Ligation mit dem Plasmid zu produzieren, wurden die Primer CYP1A2 To-- (Sequenz: 5'-TGA GGG TTG AGA TGG AGA CA-3') und CYP1A2\*F21L vorwärts (Sequenz s. 3.3.2.1) verwendet. Das PCR-Produkt (556bp) wurde nach Überprüfung der Spezifität in der Agarose-Gel-Elektrophorese aus dem Gel extrahiert (QIAQuickGelExtractionKit, Qiagen, s.o.). Daraufhin wurde zu 4µl des Amplifikats 1µl Salzlösung und 1µl pCR®2.1TOPO®-Vektor (TOPO TA Cloning ® Kit Invitrogen, s.o.) zugegeben, die Reaktionslösung zuerst für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit Eis auf 4°C gekühlt.





#### Legende zu pCR®2.1-TOPO®

(3981 Basenpaare):

LacZα-Fragment: Basenpaare 1-547

Bindungsstelle des M13 Rückwärts-Primer: Basenpaare 205-221

Polylinker: Basenpaare 234-357

Bindungsstelle des T7 Promoter: Basenpaare 364-383

Bindungsstelle des M13 Vorwärts-Primer: Basenpaare 391- 406

f1-Replikationsstart: Basenpaare 548-985

Kanamycin-Resistenzgen (offenes Lesenraster): Basenpaare 1319-2113

Ampicillin-Resistenzgen (offenes Lesenraster): Basenpaare 2131-2991

pUC-Replikationsstart: Basenpaare 3136-3809

**Abbildung 6: pCR®2.1TOPO®-Vektor der Firma Invitrogen (vgl. TOPO TA Cloning®, Invitrogen, 2004)**

Für die anschließende Transformation wurden jeweils 2µl der TOPO-Reaktionslösung in 2ml-Reaktionsgefäße zu den Wirtsbakterien gegeben, für 30 Minuten bei 4°C, dann 30 Sekunden bei 42°C auf dem Schüttler inkubiert und wieder kurz gekühlt. Anschließend wurden pro Ansatz 250µl SOC-Medium hinzugegeben und für 60 Minuten auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert.

Zur Kolonisierung der Bakterien wurden jeweils einmal 75µl bzw. 175µl des Ansatzes auf einem selektiven Medium (LB-Medium, ICN, Ohio, USA) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur genauen Selektion der Klone wurde in je 12 mal 3ml LB-Amp-Medium (3µl Ampicillin auf 3ml LB-Medium) in Reagenzgläsern jeweils eine Kolonie gegeben, ehe die Medien über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert wurden.

Zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA aus den Wirtszellen durch enzymatische und osmotische Lyse isoliert (FastPlasmidMiniKit, Eppendorf, Hamburg).

### 3.4.2 Expressionssystem

Für die Quantifizierung von induzierenden bzw. inhibierenden Faktoren eines Spenderorganismus auf die Genexpression eignet sich ein Expressionsvektor, der gentechnisch verändert und in einen Empfängerorganismus transfiziert wird. Nach Ligation der Fremd-DNA mit dem Vektor wird dieses Konstrukt zunächst in Bakterien vermehrt. In der transfizierten eukaryontischen Zelle wird anschließend das gewünschte Gen exprimiert. Für diesen Zweck ist im Vektorkonstrukt zusätzlich ein eukaryontischer Promotor integriert. Als Empfängerorganismus eignet sich eine Zellkultur, die das Gen zu exprimieren vermag. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kointransfektion durchgeführt und ein weiterer Vektor, der die DNA der Renilla-Luziferase enthielt und als interner Standard diente, in die Empfängerzellen aufgenommen.

Vor der eigentlichen funktionellen Testung wurde die Expression der Cytochrom-Allele (CYP1A2\*1F „A“ bzw. CYP1A2\*1F „C“) mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, s. u.) stimuliert, um geringe Unterschiede in den Expressionsraten zwischen den Allelen deutlicher darstellen zu können. Der abschließende Luziferase-Assay wurde in drei adhärenenten Zelllinien durchgeführt.

#### 3.4.2.1 DNA-Ligation

Zur Erzeugung eines Konstrukts, das sich des Photinus-Luziferase-Gens zur Aktivitätsbestimmung bedient (Reportergen), wurde der Vektor pGL3-Enhancer (Promega Corporation, s. o.) gewählt. Er enthält u.a. die cDNA der Feuerfliegen-Luziferase (*luc+*) und einen Polylinker (bzw. „multiple cloning site“) für die Ligation der Fremd-DNA. Zur Verstärkung der Transkription besitzt das Konstrukt einen SV40-Enhancer. Zusätzlich trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen, ein synthetisches poly(A)-Signal sowie ein spätes SV40 poly(A)-Signal, um die Transkriptionseffizienz zu erhöhen (Abbildung 7).

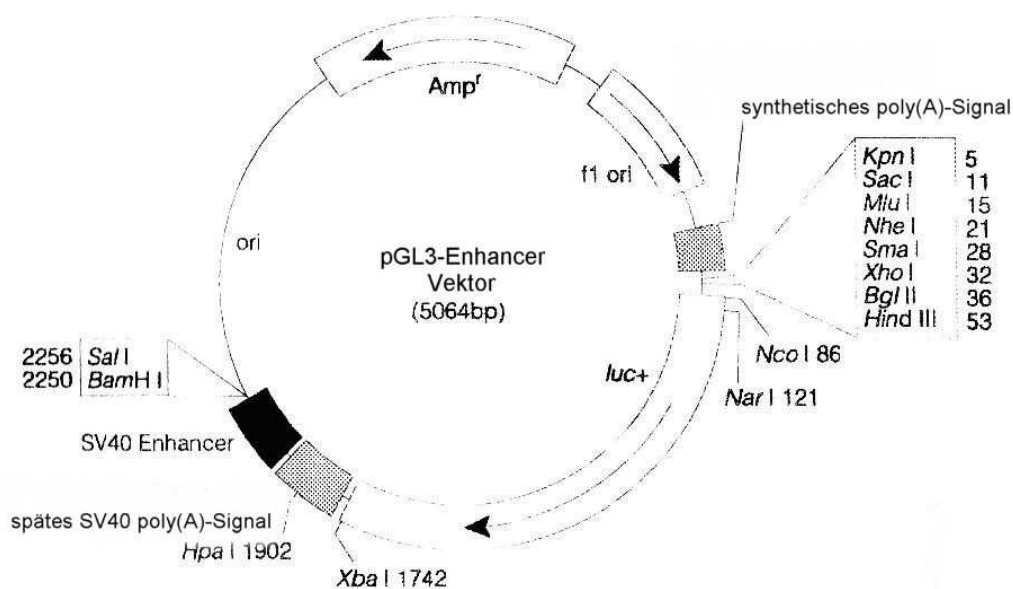


Abbildung 7: pGL3-Enhancer-Vektor (aus: Groskreutz et al., 1995)

Für die Ligation wurden zunächst in der Spender-DNA Schnittstellen erzeugt, die den Insertionsstellen des Vektors entsprachen. Dieser Verdau wurde in 500µl Reaktionsgefäßen bei 37°C über Nacht mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III durchgeführt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau der Spender-DNA**

REAGENZ	MENGE
H <sub>2</sub> O	7µl
Puffer R+	4µl
<i>Hind</i> III	2µl
<i>Xho</i> I	2µl
DNA-Matritze	25µl

Die Größe der Restriktionsfragmente wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft, anschließend erfolgte eine Reinigung der Fragmente aus dem Gel (QIA QuickGelExtractionKit, Qiagen).

Für die Ligation der Fremd-DNA aus den Proben „Ola-518“ und „Ola-572“ mit dem Luziferase-Vektor pGL3-Enhancer wurden jeweils 15µl DNA und 1µl Vektor gemischt und bei 56°C fünf Minuten lang geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz mit 2µl 10x Ligasepuffer und 1µl T4 Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.4.2.2 Zellkultur**

Als Expressionssysteme wurden die Zelllinien Cos-7 (Fibroblasten-Zelllinie aus dem Nierengewebe Grüner Meerkatzen), HeLa (humanes Zervixkarzinom) und Kelly (humanes Neuroblastom) eingesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen wurden alle Arbeiten mit den Zellkulturen an einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen und sterilen Geräten durchgeführt.

Die Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 4% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre gezogen. Als Nährmedium für die Cos-7- und Kelly-Zelllinie wurde D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4mM L-Glutamin, 1,5g/l NaCO<sub>3</sub>, 1mM Natriumpyruvat) angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (fetal calf serum, kurz FCS) und 2mM Glutamin verwendet. Für die Kelly-Zelllinie wurde dem Nährmedium zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Für das Nährmedium für die HeLa-Zelllinie wurde E-MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS angereichert. (E-MEM enthielt zusätzlich EBSS (Earle's Balanced Salt Solutions), 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat und 0,1mM NEAA (non-essential amino acids).

#### **3.4.2.2.1 Initiale Kulturbedingungen**

Alle Zelllinien wurden in Aliquots von  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen in einem Einfriermedium aus 90% fetalem Kälberserum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, s. u.) bis zum Beginn der Zellkultur bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zu Versuchszwecken wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37°C schnell aufgetaut. Um die toxische Wirkung des Einfriermediums und speziell des hygroskopischen DMSO gering zu halten, wurde dieses rasch entfernt. Dafür wurden die Zellaliquots nach dem Antauen in jeweils 20ml Kulturmedium pipettiert und einmal abzentrifugiert. Danach wurden sie in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und zu jeweils 30ml Medium in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen hinzugegeben und im Brutschrank bei 37°C und 4% CO<sub>2</sub> in gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre inkubiert.

#### **3.4.2.2.2 Passagieren von Zellen**

Sobald die adhärennten Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche einen hohen Konfluenzgrad (70-80%) erreicht hatten, wurden sie verdünnt (Verhältnis 1:5) in neue Kulturflaschen umgesetzt. Dafür wurden Wachstumsmedium und gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, kurz PBS) (ohne Kalzium und Magnesium) im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Das verbrauchte Nährmedium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt

und die Zellen wurden mit 5ml PBS pro Flasche zweimal gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden pro Flasche 2ml Trypsin mit EDTA hinzugegeben und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Schütteln unterstützt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 3ml Kulturmedium pro Gefäß gestoppt. Schließlich wurden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen in 30ml komplettem Medium in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Dieser Vorgang wurde jeden zweiten Tag wiederholt.

#### **3.4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Kammer**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden aus den Zelllösungen Aliquots entnommen, in einer 1:5-Verdünnung mit Trypan-Blau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Trypan-Blau ist ein saurer Farbstoff, der sich an Proteinstrukturen des Cytoplasmas anlagert, jedoch nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen kann. Somit färbt er selektiv tote Zellen an, und wird vielfach zur Vitalitätsbestimmung eingesetzt. Die Lebendzellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante ( $10^4$ )

#### **3.4.2.3 Transiente Kotransfektion**

Unter Transfektion versteht man den Transfer fremder DNA in eukaryontische Zellkulturen. Da die Fremd-DNA in der Wirtszelle innerhalb weniger Tage abgebaut wird, spricht man von transienter Transfektion. Sollen in der Zielzelle Proteine exprimiert werden, wird dazu auf geeignete Expressionsvektoren zurückgegriffen. Diese werden in Bakterien vermehrt und besitzen die dazu notwendigen Elemente wie Resistenzgen und Replikationsursprung. Nach einer Transfektion in eine eukaryontische Zelle findet hier nur die Expression des gewünschten Zielgens statt. Die Expression eines zweiten (kotransfizierten) Gens dient dabei als Kontrolle für die Effizienz des Transfektionsvorganges.

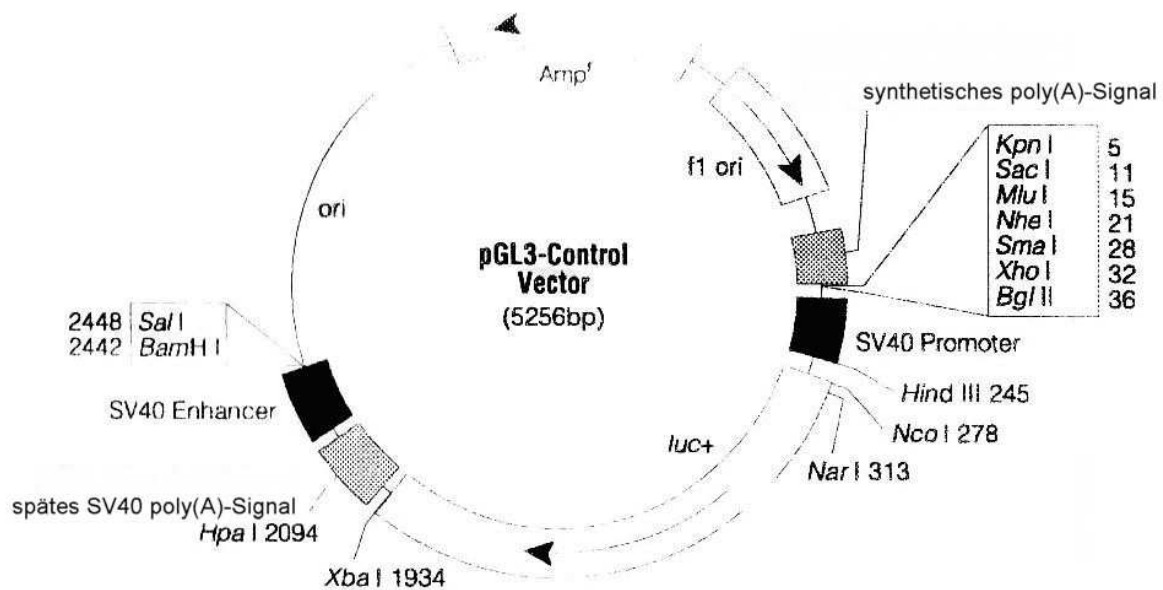
Als Expressionsvektoren in der vorliegenden Arbeit dienten pHRG-TK, pGL3-Enhancer, pGL3-Control (Promega Corporation, s.o.) und die mit den CYP1A2\*1F-Allelen „A“ und „C“ ligierten Vektorkonstrukte (bezeichnet als Ola518Lig”A“ bzw. Ola572Lig”C“). pHRG-TK enthält hRluc-DNA, d.h. das Luziferase-Gen der Meeresqualle *Renilla reniformis* sowie den Thymidinkinase-Promoter des Herpes-simplex-Virus. Letzterer stellt eine niedrige bis mittlere Expression der Renilla-Luziferase in Säugetierzellen sicher. Dies diente im Luziferase-Assay als interner Standard.

Um Vergleichswerte zu den Expressionsraten der Testkonstrukte zu gewinnen, wurden Aliquots aller Zellreihen darüber hinaus mit einer Positiv-Kontrolle bzw. einer Negativ-Kontrolle transfiziert. Die Positiv-Kontrolle bestand aus der Kombination von pHRG-TK-Vektor und pGL3-Control-Vektor. Letzterer ist analog zu pGL3-Enhancer konstruiert, enthält jedoch zusätzlich einen SV40-Promoter (Abbildung 8). Die Negativ-Kontrolle wurde mit dem unmodifizierten pGL3-Enhancer kotransfiziert.

Da eukaryontische Zellen Fremd-DNA spontan nicht in ausreichender Menge aufnehmen, wurde die DNA unmittelbar vor dem Experiment mit einem Transfektionsreagenz aus nicht-liposomalen Lipiden (FuGene®, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) inkubiert.

Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Allele „A“ und „C“ des CYP1A2\*1F-Polymorphismus wurden für jede Zelllinie vier Untersuchungsreihen erstellt.

Demnach wurden die Zellen mit einer Negativkontrolle, einer Positivkontrolle, einem Vektorkonstrukt des Alles „A“ (Ola518Lig”A“) sowie einem Vektorkonstrukt des Alles „C“ (Ola572Lig”C“) transfiziert.



**Abbildung 8: pGL3-Control-Vektor (aus: pGL3 Luciferase Vectors, Promega, 2002)**

Eingangs wurden jeweils 48 wells einer lichtundurchlässigen 96-well-Zellkultur-Platte mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro well jeder Linie besät, anschließend wurden 200µl des jeweiligen Nährmediums pro well zugegeben und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C und 4% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Herstellung der vier Transfektionslösungen wurde zunächst für jede Untersuchungsreihe eine Stocklösung für jeweils 40 Ansätze erstellt (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Ansätze der Stocklösungen**

Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Ola518Lig''A''	Ola572Lig''C''
7,5ml Fugene	7,5ml Fugene	7,5ml Fugene	7,5ml Fugene
2,5µl phRG-TK	2,5µl phRG-TK	2,5µl phRG-TK	2,5µl phRG-TK
2,5µl pGL3-Enhancer	2,5µl pGL3-Control	3,2µl Ola518Lig''A''	2,1µl Ola572Lig''C''

Anschließend wurden diese Ansätze mit den jeweiligen Nährmedien der Zellen zu Transfektionslösungen vermischt (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Ansätze der Transfektionslösungen**

Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Ola518Lig''A''	Ola572Lig''C''
1,30ml Nährmedium	1,30ml Nährmedium	1,30ml Nährmedium	1,30ml Nährmedium
2,03µl Stocklösung	2,03µl Stocklösung	2,14µl Stocklösung	1,97µl Stocklösung

Danach wurden die Zellen mit jeweils 200µl der entsprechenden Transfektionslösung pro well für 3 Stunden bei 37°C und 4% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.4.2.4 Zellstimulation

Die Zellstimulation diente hier der Erfassung differierender Expressionsraten der *CYP1A2*-Allele auf einem höheren Transkriptionsniveau. Dafür wurde Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) eingesetzt. PMA gehört zur chemischen Gruppe der Phorbolster. Als lipophile Substanz ist es in der Lage, die Zellmembran zu überwinden. Im Zellinneren ruft es bei Proteinkinasen eine Konformationsänderung hervor. Die so aktivierten Proteinkinasen binden an den Promotor zahlreicher Gene und führen dadurch zu einer Verstärkung der Transkription. PMA wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Da dieses Reagenz jedoch selbst die Genexpression in geringem Maße steigert, wurden mit allen drei Zellreihen Kontrollen angelegt, die nur mit DMSO behandelt wurden und Leerwerte lieferten.

Für die Durchführung der Zellstimulation wurden eine Stimulationslösung und eine Kontrolllösung hergestellt. Für die Stimulationslösung wurden 5ml der entsprechenden Zellnährmedien mit 50µl verdünnter PMA-Lösung und 50µl Ethanol vermischt. Zur Herstellung der Kontrolllösung wurde statt der PMA-Lösung 50µl DMSO zu 50µl Ethanol gegeben. Nach drei Stunden wurde die Transfektionslösung aus den wells abgesaugt und jeweils 24 wells jeder Zelllinie über Nacht bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Schrank mit der Stimulationslösung bzw. der Kontrolllösung inkubiert (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Schema der Zellstimulation: hell unterlegt: Kontrolle, dunkel unterlegt: Stimulation**

	1	2	3	4	5	6
A	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle
B	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle
C	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "
D	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "
E	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle	Negativ-Kontrolle
F	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Positiv-Kontrolle
G	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "	Ola518 Lig" A "
H	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "	Ola572 Lig" C "

### 3.4.2.5 Dualer Luziferase-Assay

Zur Visualisierung der Genexpression in den transfizierten Zellen wurde ein Dualer Luziferase-Assay (Promega Corporation, s.o.) durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Kombination der unterschiedlichen Biolumineszenzreaktionen von *Photinus pyralis* und *Renilla reniformis*. Deren Luziferasegene waren Teil von Reporterplasmiden, die zur Konstruktion von allelspezifischen Vektoren benutzt wurden. Die Vektorkonstrukte verfügten über Amplifikate von 467bp regulatorischer DNA des *CYP1A2*-Gens, die mit Ausnahme der Zielvariante „A“ oder „C“ keine weiteren Polymorphismen enthielten. Mit ihnen wurden an drei Zelllinien transiente Transfektionen durchgeführt. Die Luziferaseaktivität wurde sodann als Ausdruck der Genexpression gemessen.

Für den Assay wurden die am Vortag stimulierten Zellen nach Absaugen des verbrauchten Nährmediums mit jeweils 200µl 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden 20µl Lysispuffer (Passive Lysis Buffer, Promega Corporation, s.o.) pro well hinzugegeben, mit dem die Zellen bei Raumtemperatur 15 Minuten auf dem Schwenker inkubiert wurden. Der Lysispuffer löst

zugleich das Luziferin als Voraussetzung für den Luziferase Assay. Die Zellkulturplatten wurden dann nacheinander zur Messung in ein Luminometer gegeben, in dem über ein Injektionssystem die zwei weiteren Reagenzien des Assays zugegeben wurden. Durch Zugabe des ersten Reagenz des dualen Luziferase Assays (LARII, Promega Corporation, s.o.) wird die Luziferase der Feuerfliege aktiviert. Dabei wird der Leuchtfarbstoff Luziferin mit Hilfe von  $Mg^{2+}$ , ATP und Sauerstoff oxidiert und erzeugt Licht. Als Kontroll-Richtmaß dient die Renilla-Lumineszenz, welche durch Beifügen der zweiten Lösung (Stop&Glo®-Reagent, Promega Corporation, s.o.) gestartet wird. Gleichzeitig wird damit die Reaktion der *Photinus*-Luziferase gestoppt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms PRISM 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

### 3.5 Statistische Auswertung

#### 3.5.1 Wahrung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium in der untersuchten Stichprobe

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium ist eine mathematische Erklärung von Genotyp- und Allelhäufigkeiten innerhalb einer Population, die G.H. Hardy und W. Weinberg 1908/09 unabhängig voneinander ableiteten (Hardy, 1908; Stern, 1943). Sie basiert auf fünf grundlegenden Annahmen:

1. Die untersuchte Population ist ausreichend groß.
2. Es besteht kein Genfluss zwischen verschiedenen Populationen.
3. Neumutationen sind vernachlässigbar.
4. Die Individuen paaren sich zufällig.
5. Es besteht keine natürliche Selektion innerhalb der Population.

Sind diese Annahmen erfüllt, bleiben die Genotyp- und Allelfrequenzen über Generationen hinweg weitgehend unverändert.

Nach dem Hardy-Weinberg-Modell kann die Häufigkeit der Heterozygoten ermittelt werden: Für ein Allelpaar A und a sei die Häufigkeit von A gleich p und die Häufigkeit von a gleich q. Daraus folgt:  $p+q=1$ . In der Population können die Genotypen AA, Aa und aa vorkommen. Wenn sie zufallsgemäß untereinander gekreuzt werden, erscheinen in der nachfolgenden Generation die Genotypen nach der folgenden Regel:

$$AA=p^2, Aa+aA=2pq, aa=q^2$$

$$\text{daraus folgt: } p^2+2pq+q^2=(p+q)^2=\text{konstant}$$

Abweichungen von den zu erwartenden Häufigkeiten können auf eine Verletzung der zugrunde liegenden Annahmen hinweisen (z.B. zu kleine Stichprobengrößen, Auftreten von Neumutationen) oder auch auf Unstimmigkeiten im Prozess der Genotypisierung. Sie lassen sich durch Vierfeldertests ( $\chi^2$ -Test) analysieren. Dabei ist zu beachten, dass die beobachteten Häufigkeiten gleichzeitig die Grundlage bilden für die Berechnung der nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Häufigkeiten und beide Werte somit voneinander abhängig sind. Dem wird Rechnung getragen durch die Zahl der Freiheitsgrade im Vierfeldertest (n-2, wobei n der Anzahl möglicher Genotypen entspricht). Für die vorliegende Arbeit erfolgte online eine Prüfung auf Konformität aller Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium ([http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/\\_Popgen/genetik/applets/kitest.htm](http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm)). Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  gewählt. Bei einem Freiheitsgrad  $f=1$  entspricht dies einem  $\chi^2$ -Wert unter 3,841.  $\chi^2$ -Werte, die größer als 3,841 waren, bedeuteten somit eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<5\%$ .

### 3.5.2 Kolmogorov-Smirnov-Test

Der Kolmogorov-Smirnov-Test ist ein Anpassungstest, um die empirische Verteilung von Messgrößen mit einer theoretischen Verteilung zu vergleichen oder um zu prüfen, ob die Verteilung von Variablen der Gauß'schen Verteilungskurve (Normalverteilung) folgt. Dies ist u.a. eine Voraussetzung für die multiple lineare Regression. Die Werte einer Stichprobe sind gemäß diesem Test dann normalverteilt, wenn der p-Wert größer als 0,10 ist. Für die vorliegende Arbeit wurde der Test auf den logarithmierten Quotienten aus Olanzapinserumspiegel und Olanzapindosis angewendet (PRISM 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

### 3.5.3 t-Test für unabhängige und für gepaarte Stichproben

t-Tests sind Lagetests, die bei bekannter Verteilung der Zufallsvariablen bestimmte Parameter, wie zum Beispiel Erwartungswerte, überprüfen.

Man verwendet den t-Test für zwei unabhängige Stichproben, um zu prüfen, ob der Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben signifikant ist. In der vorliegenden Arbeit fand er Verwendung beim direkten Vergleich der Mittelwerte des Olanzapinserumspiegels von Männern und Frauen, Patienten bis einschließlich 59 und ab 60 Jahren, Rauchern und Nichtrauchern, Patienten mit und ohne positive Angaben zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, sowie von Patienten mit und ohne inhibierende bzw. induzierende Zusatzmedikation.

Der t-Test für gepaarte Stichproben wird verwendet, um den Unterschied zwischen den Wertepaaren einer Variablen darzustellen, zum Beispiel Daten einer Vorher-Nachher-Studie. In der vorliegenden Arbeit wurde er genutzt, um die Differenz zwischen den mit PMA stimulierten und den nicht stimulierten Zellen zu beurteilen.

In beiden Fällen zeigte ein p-Wert unter 0.05 einen signifikanten Unterschied an.

Alle Tests wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 12.0 bzw. Version 16.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) durchgeführt.

### 3.5.4 Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse ist ein statistisches Werkzeug, mit dem sich der Einfluss von mehreren erklärenden oder unabhängigen Variablen auf eine abhängige Zielgröße bestimmen lässt. Man kann sie nutzen, um den funktionalen Zusammenhang zwischen mehr als zwei Variablen zu beschreiben und gelangt damit zu prognostischen Aussagen für eine als abhängig angesehene Variable Y (Zielvariable), deren Wert von der Gruppe der unabhängigen Variablen  $X_1, \dots, X_i$  beeinflusst wird. Mit Hilfe des Regressionsmodells ist es nun möglich festzustellen, welcher Anteil der Varianz der abhängigen Variablen durch jede unabhängige Variable erklärt wird, wenn keine Interaktionen angenommen werden. Diese Aussagen werden über die Quadratsummen der Effekte getroffen.

Soweit gewünscht, können zusätzlich Interaktionen berücksichtigt werden.

Um die Aussagekraft des Modells zu überprüfen, bedient man sich des p-Wertes. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha=0,05$  gewählt.

In der vorliegenden Arbeit galten als Zielvariablen das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie der Olanzapinserumspiegel. Da dieser mit der Höhe der Medikamentendosis schwankt, wurde für alle Berechnungen der logarithmierte Quotient aus Serumspiegel und Dosis verwendet (s. 3.5.2). Als unabhängige Variablen wurden Geschlecht, Alter  $\geq 60$  Jahre, Raucher/Nichtraucher, das Vorhandensein unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) und die Einnahme induzierender oder inhibierender Komedikation berücksichtigt. Diese Merkmale lagen als dichotome Variablen vor (Tabelle 12).



**Tabelle 12: Variablen und ihre Ausprägung**

<u>MERKMAL</u>	<u>AUSPRÄGUNG</u>
Geschlecht	männlich (=1) / weiblich (=0)
Alter $\geq 60$ Jahre	ja (=1) / nein (=0)
Raucherstatus	ja (=1) / nein (=0)
UAW	ja (=1) / nein (=0)
induzierende Komedikation	ja (=1) / nein (=0)
inhibierende Komedikation	ja (=1) / nein (=0)

Da in der Modellgleichung nur erklärende Variablen betrachtet werden können, die stetig und/oder binär sind, mussten die weiteren Einflussgrößen, die Genotypen, die jeweils drei Zustände annehmen können, in dichotome Ersatz-Variablen umgeformt werden. Dies geschah anhand einer so genannten Dummy-Kodierung. Für die Umwandlung der Variablen wurde angenommen, dass das seltenere Allel dominant sei: Dies ist nahe liegend, da das Merkmal so in der Natur einen entscheidenden Vorteil hat, um dem Selektionsdruck Stand zu halten. Die Kodierung erfolgte folgendermaßen:

Für die CYP1A2\*1F (rs762551) Genotypen (C ist Wildtyp-Allel) (Tabelle 13):

**Tabelle 13: „dummy“-Variablen für den CYP1A2\*1F-Polymorphismus**

VARIABLE	AA	AC	CC
*1F C+	0	1	1
*1F C-	1	0	0

Für die rs2069519 Genotypen (G ist Wildtyp-Allel) (Tabelle 14):

**Tabelle 14: „dummy“-Variablen für den rs2069519-Polymorphismus**

VARIABLE	GG	GT	TT
rs2069519 T +	0	1	1
rs2069519 T -	1	0	0

Aus diesen Werten wurde eine Tabelle erstellt, die als Ausgangspunkt für das spätere Regressionsmodell diene. Bei Abzug fehlender Werte reduzierte sich die Gesamtzahl der auswertbaren Fälle für diese Analyse auf 125.

Die Regressionsanalyse wurde ebenfalls mit SPSS 12.0 bzw. 16.0 durchgeführt.

### 3.5.5 Haplotypanalyse

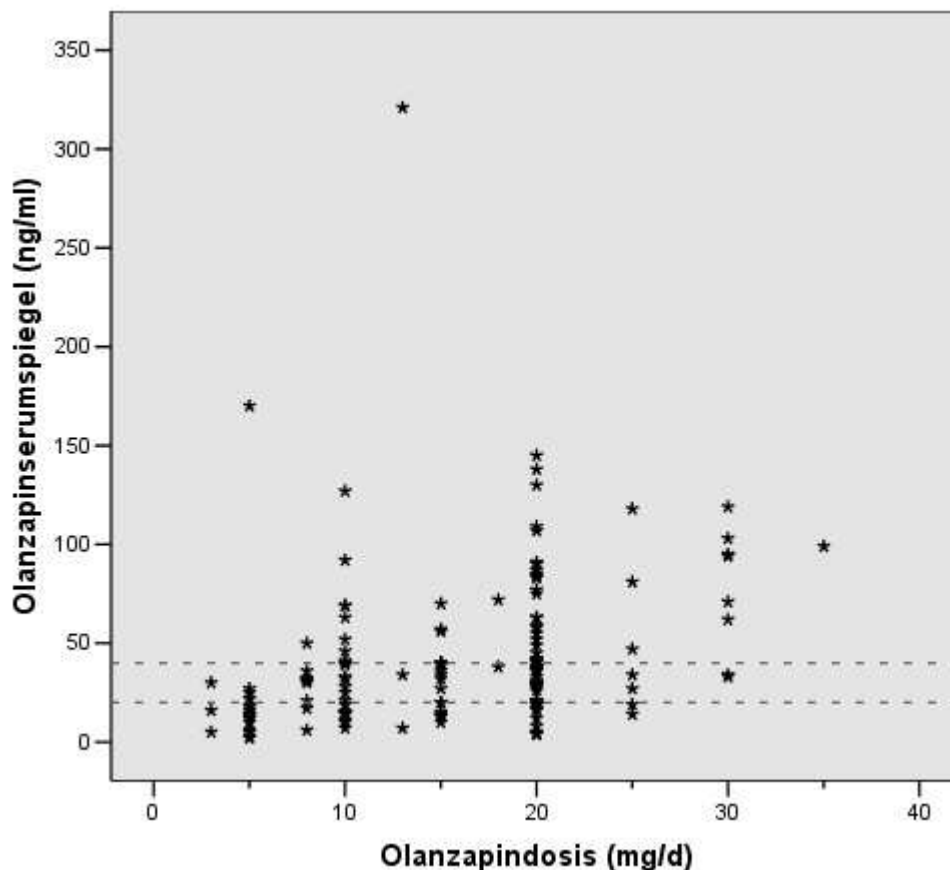
Ausgehend von den ermittelten CYP1A2-Genotypen wurden in der vorliegenden Arbeit die Frequenzen der möglichen Haplotypen untersucht.

Die Ableitungen wurden mit Hilfe des Programms Haploview Version 3.32 bzw. Version 4.1 (Broad Institute, Cambridge, USA, 2006) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Olanzapinserumspiegel

Die 145 Patienten nahmen während der Studie Olanzapindosen von 2,5mg bis 35mg (Mittelwert: 15,5mg) ein. Die hier verwerteten Angaben entsprechen der letzten Tagesdosis vor der Blutabnahme für die Serumspiegelbestimmung. Insgesamt streute der Medikamentenspiegel von 2ng/ml bis 321ng/ml (Median: 43,5ng/ml).



**Abbildung 9: Olanzapinserumkonzentration in Relation zur täglich verabreichten Dosis und Referenzbereich nach Rao et al. (2001) (gestrichelt)**

Zugrunde gelegt wurde das Erreichen eines „steady state“ durch Gabe der gleichen Dosis über einen Zeitraum von einer Woche. Für eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen wird im Folgenden jeweils der Mittelwert des dosiskorrigierten Serumspiegels mit dem zugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Der dosiskorrigierte Serumspiegel errechnet sich als Quotient von Serumspiegel in ng/ml und Tagesdosis in mg/d. Für die Gesamtstichprobe ergibt sich hier ein durchschnittlicher Wert von 3,2[ng/ml]/[mg/d], mit einem Standardfehler von  $\pm 0,3$ . Alle weiteren Berechnungen wurden mit dosiskorrigierten Serumspiegeln durchgeführt. Zur Vereinfachung werden diese nachfolgend in ng/ml angegeben.

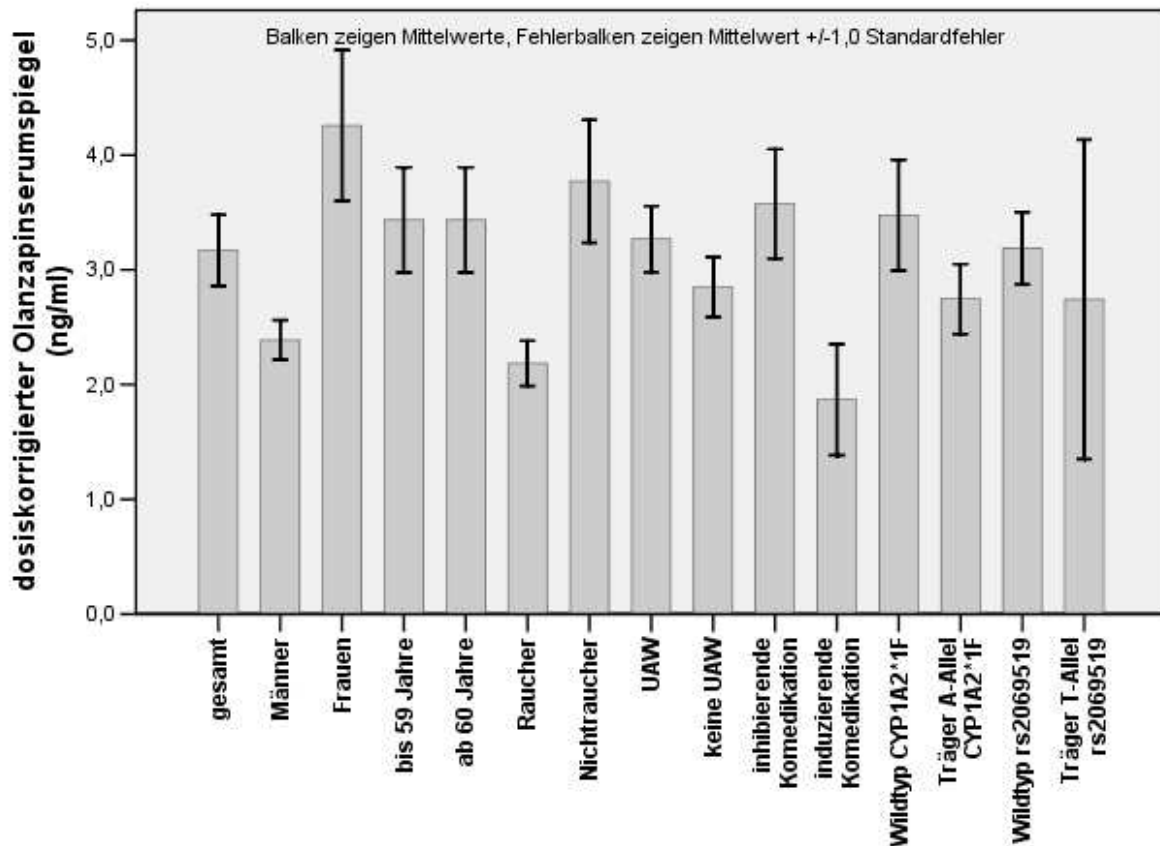


Abbildung 10: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel der einzelnen Teilkollektive im Vergleich

#### 4.1.1 Therapeutischer Bereich

Bei 53 Patienten (36,6%) lag der Olanzapinserumspiegel im therapeutischen Bereich von 20ng/ml bis 40ng/ml (durchschnittlich 31,0ng/ml). Der Mittelwert des dosiskorrigierten Serumspiegel lag bei 2,6ng/ml ( $\pm 0,2$ ).

22 Patienten (41,5%) in dieser Gruppe waren weiblich, 31 (58,5%) männlich. 16 Personen (30,2%) aus dieser Gruppe rauchten. Vier der Personen (7,6%), deren Olanzapinspiegel im therapeutischen Bereich lag, waren 60 Jahre und älter.

#### 4.1.2 Serumspiegel nach Geschlecht

Insgesamt nahmen 63 Frauen (43,4%) an der Studie teil. Ihnen wurde Olanzapin in Tagesdosen zwischen 3mg und 35mg (durchschnittlich 15,1mg) verabreicht. Die dosiskorrigierten Serumspiegel erreichten Werte im Bereich von 0,2ng/ml bis 34,0ng/ml. Mittelwert: 4,3ng/ml ( $\pm 0,7$ ).

10 der Teilnehmerinnen waren 60 Jahre und älter. 21 Patientinnen betrieben Nikotinabusus. 6 Patientinnen gaben während der Therapie mit Olanzapin an, unter Nebenwirkungen zu leiden. In 14 Fällen nahmen die Patientinnen neben Olanzapin weitere Medikamente ein.

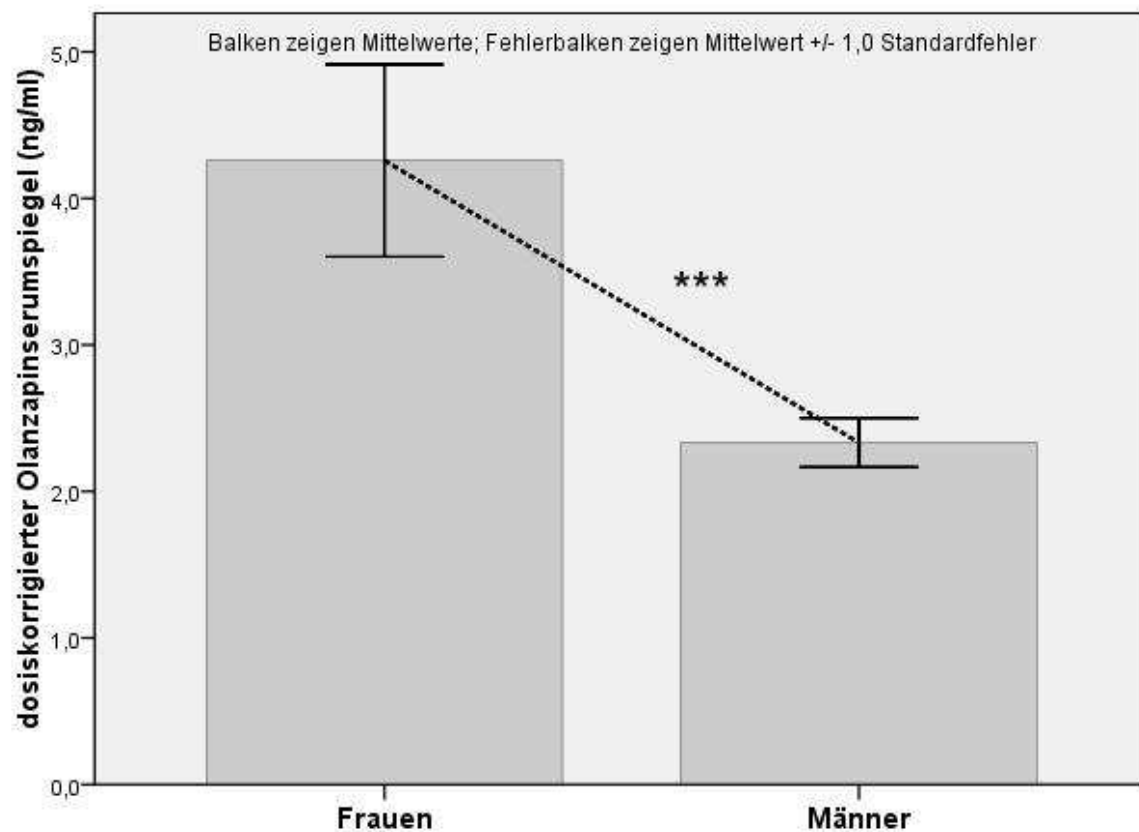
Die Zahl der männlichen Studienteilnehmer belief sich auf 82 (56,6%). Sie erhielten Olanzapin in Tagesdosen von 3mg bis 30mg (Mittelwert 15,9mg/d). Die Spiegel von Olanzapin im Serum lagen - dosiskorrigiert - zwischen 0,2ng/ml und 6,9ng/ml (Mittelwert 2,3ng/ml  $\pm 0,2$ ).

Fünf der Teilnehmer waren 60 Jahre und älter. 30 der 82 Männer rauchten regelmäßig (36,6%). 2 Patienten klagten über das Auftreten von Nebenwirkungen, bei 12 der Patienten

fehlten hierzu nähere Angaben. 42 Teilnehmer nahmen zusätzlich zu Olanzapin weitere Medikamente ein, darunter befanden sich 5 Patienten, die mit einem Induktor (jeweils Carbamazepin) des untersuchten Cytochroms und 11 Patienten, die mit einem Inhibitor (6 Personen mit Levomepromazin, 3 Thioridazin, jeweils 1 Perazin bzw. Ranitidin) behandelt wurden. 2 Studienteilnehmer nahmen sowohl ein induzierendes als auch ein inhibierendes zusätzliches Medikament ein (Carbamazepin und Levomepromazin bzw. Carbamazepin und Thioridazin).

Im t-Test für ungepaarte Stichproben ergab sich ein p-Wert von 0,002 für den Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen (Männer – Frauen, Abbildung 11).

Im Folgenden werden die Signifikanzen mit Sternchen (\*) abgebildet, wobei  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$  und  $***=p<0,005$ .



**Abbildung 11: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Frauen (N=63) und Männern (N=82) im Vergleich (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

#### 4.1.4 Serumspiegel bei Patienten verschiedener Altersgruppen

Die Studienteilnehmer waren zum Untersuchungszeitpunkt im Jahr 2003 zwischen 21 und 81 Jahre (durchschnittlich 39,1 Jahre) alt.

Die Zahl der Patienten, die 60 Jahre und älter waren, betrug 14 (9,7%). Diese Teilnehmer erhielten 5mg bis 20mg Olanzapin pro die (im Durchschnitt 10,4mg/d). Die dosiskorrigierten Serumspiegel des Medikaments lagen hier bei Werten von 1,1ng/ml bis 7,3ng/ml mit einem Mittelwert von 3,4ng/ml ( $\pm 0,46$ ).

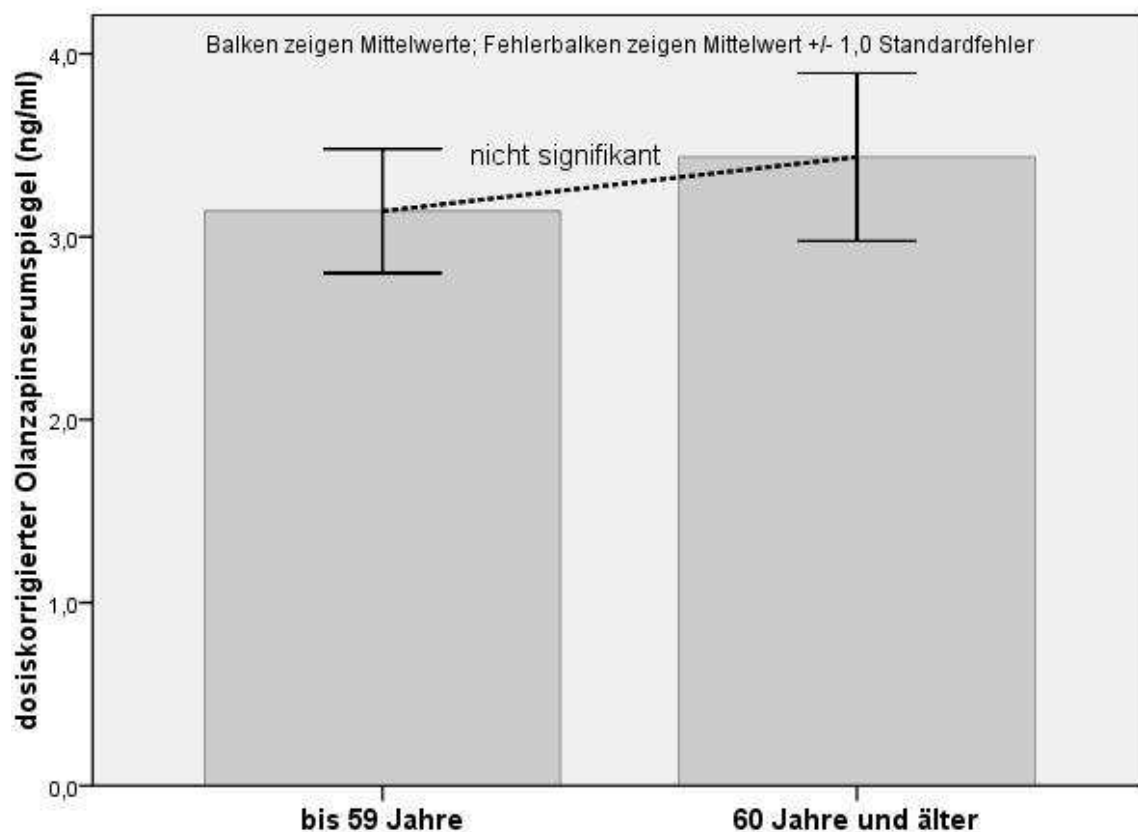
In dieser Gruppe waren 9 Frauen und 5 Männer. Ein Patient (0,7%) betrieb Nikotinabusus, bei zwei Patienten fehlten hierzu nähere Angaben. Kein Patient gab an, unter Nebenwirkungen zu leiden, bei zwei Patienten wurde dieses Merkmal nicht erfasst. Eine Komedikation erhielten

10 Studienteilnehmer mit 60 und mehr Jahren. Darunter fielen in 2 Fällen CYP1A2-induzierende Präparate (je eine Medikation mit Omeprazol bzw. Carbamazepin).

Die Gruppe der Bis-59-Jährigen (131 Personen, 90,3%) erhielt Olanzapintagesdosen von durchschnittlich 16,1mg. Die korrigierten Serumspiegel dieser Patienten lagen im Mittel bei 3,1ng/ml  $\pm$ 0,3. (Minimum: 0,2ng/ml, Maximum: 34,0ng/ml).

Das Geschlechterverhältnis betrug 77 Frauen zu 54 Männern. Im genannten Patientenkollektiv befanden sich 50 Raucher (38,2%), bei 17 Personen war der Raucherstatus unbekannt. 8 Studienteilnehmer (6,1%) klagten über das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, bei 17 Personen fanden sich keine Angaben zu diesem Punkt. Zusätzliche Medikamente nahmen in dieser Gruppe 49 Patienten ein, davon zählte ein Präparat (Carbamazepin: 8 Patienten) zu den Induktoren und 4 Präparate (Levomepromazin: 12 Patienten, Thioridazin: 4, Ranitidin: 1, Perazin: 1) zu den Inhibitoren des Cytochroms P450 1A2.

Im t-Test für ungepaarte Stichproben ergab sich ein p-Wert von 0,779 für den Vergleich der Mittelwerte der untersuchten Altersgruppen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Patienten bis einschließlich 59 Jahre (N=131) und der Patienten ab 60 Jahren (N=14) im Vergleich (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

#### 4.1.5 Serumspiegel bei Patienten mit Nikotinabusus

Insgesamt waren von den 145 untersuchten Patienten 51 Raucher (35,2%). Sie wurden im Mittel mit einer Tagesdosis von 16,4mg Olanzapin behandelt. Die Serumspiegel/Dosis-Quotienten betrugen durchschnittlich 2,2ng/ml, Standardfehler  $\pm$ 0,2.

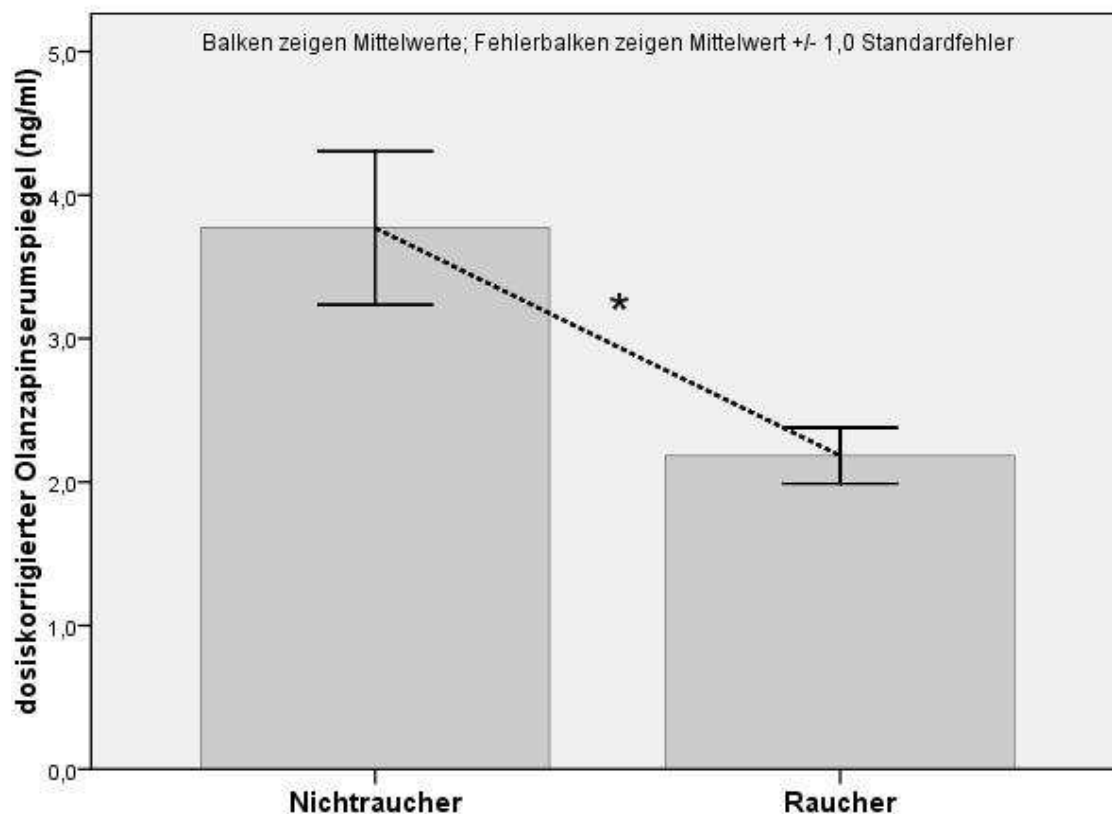
Die Gruppe der Raucher setzte sich zusammen aus 30 Männern und 21 Frauen, von denen eine 60 Jahre oder älter war. Zwei Patienten litten unter Nebenwirkungen des Medikaments

(3,9%), bei drei Patienten fehlten entsprechende Angaben. Insgesamt nahmen 31 Personen aus dieser Gruppe eine zusätzliche Medikation ein. Darunter waren 4 Patienten, die mit Carbamazepin behandelt wurden und fünf Patienten, denen Enzym-Inhibitoren verabreicht wurden (Levomepromazin: 2 Patienten; Thioridazin: 2 Patienten; Perazin: 1 Patient). Ein Patient nahm mit Carbamazepin und Thioridazin jeweils ein Medikament aus der Gruppe der CYP1A2-Inhibitoren und -Induktoren.

79 Personen (54,5% des Patientenkollektivs) waren Nichtraucher, bei 15 fehlten Angaben zum Raucherstatus. Die Nichtraucher erhielten Olanzapindosen von 2,5mg/d bis 35mg/d (Mittelwert 15,3mg/d). Die Werte der dosiskorrigierten Serumspeigel rangierten zwischen 0,2ng/ml als Minimum und 34ng/ml als Maximum. Der Durchschnittswert lag bei 3,8ng/ml  $\pm$  0,53.

Elf der nicht rauchenden Patienten waren 60 Jahre und älter. Sechs Personen (7,5%) klagten über das Auftreten von UAW, bei zwei Studienteilnehmern fehlten hierzu nähere Angaben. 50 Nichtraucher nahmen zusätzlich zu Olanzapin Medikamente ein. In 6 Fällen waren dies Enzym-Induktoren (5 Patienten Carbamazepin, 1 Patient Omeprazol) und in 13 Fällen Inhibitoren (10 Patienten Levomepromazin, 2 Patienten Thioridazin, 1 Patient Ranitidin). Zwei Patienten nahmen Präparate aus beiden Gruppen ein (jeweils Carbamazepin und Levomepromazin).

Im t-Test für ungepaarte Stichproben ergab sich ein p-Wert von 0,022 für den Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen (Raucher – Nichtraucher, Abbildung 13).



**Abbildung 13: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Nichtrauchern (N= 79) und Rauchern (N=51) im Vergleich (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

#### 4.1.6 Serumspiegel bei Patienten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen

Unter der Therapie mit Olanzapin gaben 8 Patienten Beschwerden an (5,5%). Von 19 Patienten wurden keine Angaben zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) gemacht. Bei Studienteilnehmern aus der Gruppe, die Nebenwirkungen angab, lag die tägliche Olanzapindosis zwischen 7,5mg/d und 30mg/d (Mittelwert: 16,3mg/d). Die korrigierten Serumspiegel lagen zwischen 1,1ng/ml und 4,0ng/ml (Mittelwert: 3,2ng/ml  $\pm$  0,4).

Sechs der Patienten dieser Gruppe waren weiblich, zwei männlich. Alle Patienten mit UAW waren 59 Jahre oder jünger. Von diesen gaben zwei Personen an, Raucher zu sein. 7 Personen nahmen zusätzlich Medikamente ein. Jeweils ein Patient nahm ein Medikament ein, das den Metabolismus von CYP1A2 induziert (Carbamazepin) bzw. inhibiert (Levomepromazin).

Die Zahl der Patienten, die nicht über das Auftreten von Nebenwirkungen berichteten, betrug 118 (81,4%). Sie erhielten Olanzapin in einer täglichen Dosis von durchschnittlich 16,0mg. Die Serumspiegel (dosiskorrigiert) lagen bei Werten von 0,2ng/ml bis 24,7ng/ml, mit einem Mittelwert von 2,9ng/ml  $\pm$  0,3.

Zwölf der Patienten ohne UAW waren 60 Jahre oder älter, 46 waren Raucher (bei einem Patienten hierzu keine Angaben). Von 60 Studienteilnehmern wurden zusätzliche Medikamente eingenommen. Davon induzierten zwei die Aktivität von CYP1A2 (Carbamazepin: 8 Patienten, Omeprazol: 1 Patient), vier Präparate waren Inhibitoren des Enzyms (Levomepromazin: 10 Patienten, Thioridazin: 4 Patienten, Ranitidin bzw. Perazin je 1 Patient). Drei Patienten nahmen Medikamente aus beiden Gruppen ein.

Im t-Test für ungepaarte Stichproben ergab sich ein p-Wert von 0,758 für den Vergleich der Mittelwerte der Patienten mit und der Patienten ohne Auftreten von UAW (Abbildung 14).

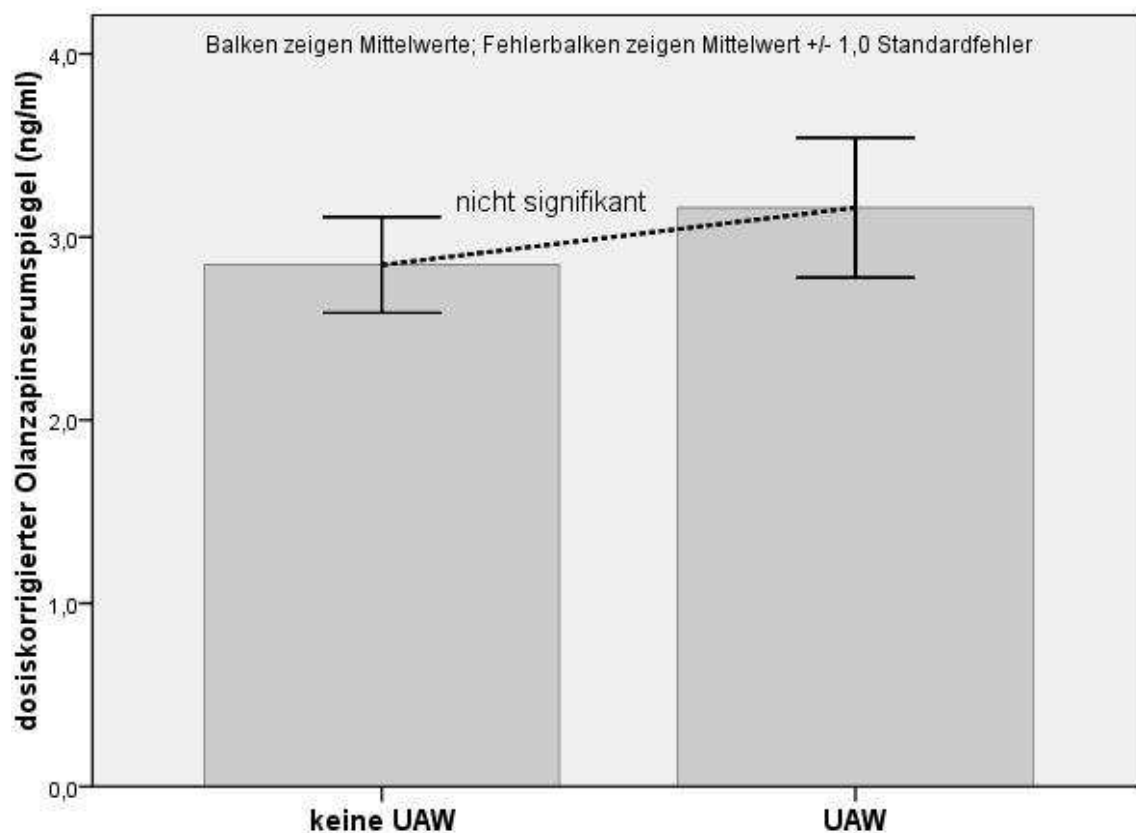
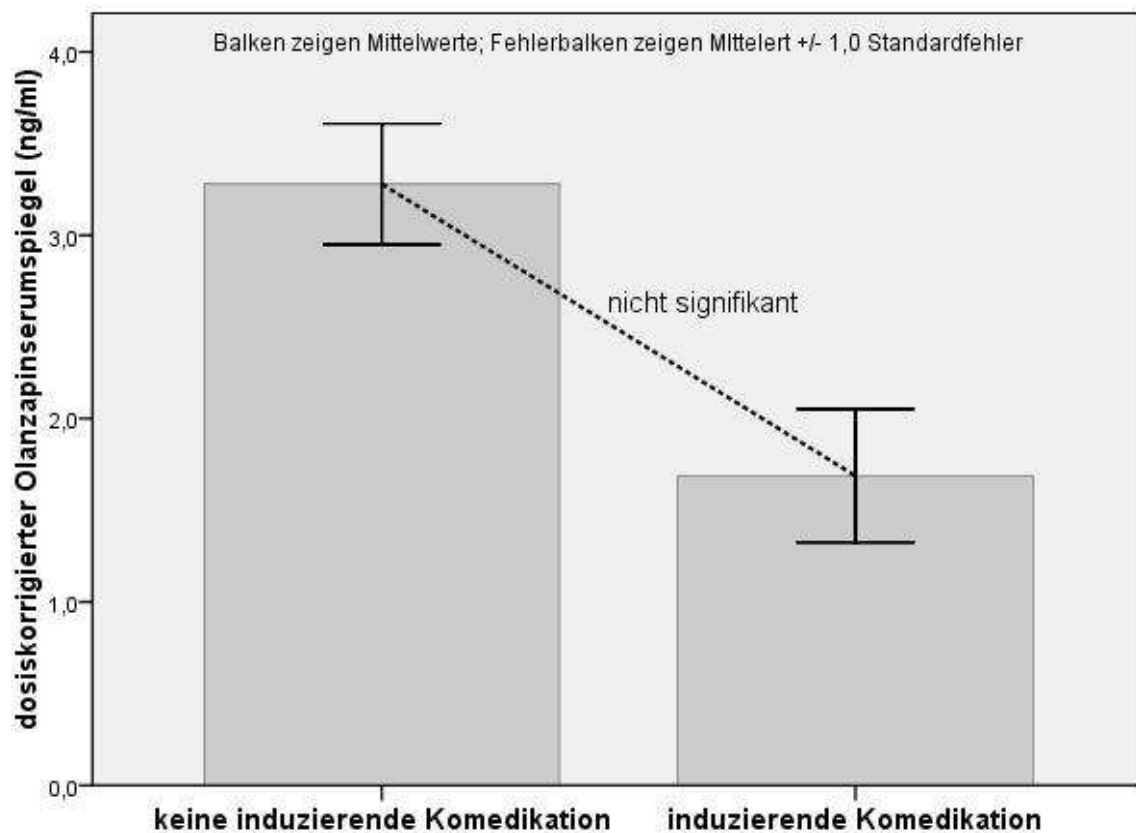


Abbildung 14: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel bei Patienten ohne (N= 8) bzw. mit (N=118) unerwünschten Arzneimittelwirkungen im Vergleich (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

#### 4.1.7 Serumspiegel bei Patienten unter Komedikation

In dem untersuchten Patientenkollektiv wurden 91 Patienten (62,8%) zusätzlich zu Olanzapin mit weiteren Medikamenten behandelt. Darunter nahmen 7 Personen (7,7%) Präparate ein, die die Aktivität des CYP1A2 steigern. Dazu zählten Carbamazepin (6 Patienten) und Omeprazol (1 Patient). Diese Studienteilnehmer erhielten täglich 2,5mg bis 25mg Olanzapin (im Mittel 13mg). Die Serumspiegel/Dosis-Werte lagen mit einem Durchschnittswert von 1,7ng/ml (SEM  $\pm 0,4$ ) zwischen 0,8ng/ml und 3,8ng/ml. Die Gruppe bestand aus vier Frauen und drei Männern. Zwei Patienten waren 60 Jahre und älter, vier Gruppenmitglieder rauchten regelmäßig. Ein Studienteilnehmer klagte über therapieassoziierte Beschwerden.

Im t-Test für ungepaarte Stichproben ergab sich ein p-Wert von 0,193 für den Vergleich der Mittelwerte der Serumspiegel von Patienten, die induzierende Komedikation einnahmen zu den Serumspiegeln von Patienten ohne induzierende Komedikation (Abbildung 15).

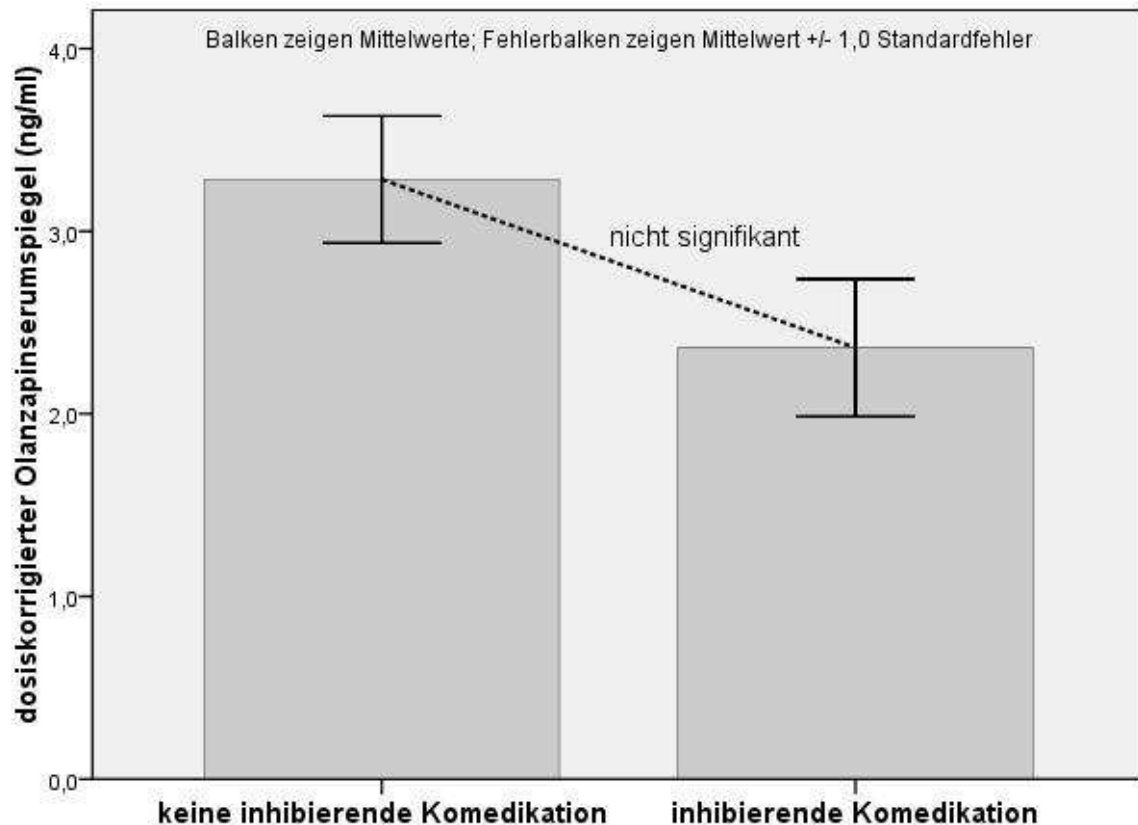


**Abbildung 15: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel bei Patienten mit und ohne induzierende Komedikation (N=7 bzw. N= 138) (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

15 Studienteilnehmer (16,5%) nahmen Medikamente ein, die die Aktivität des Cytochroms P450 1A2 herabsetzen. Zu diesen Präparaten zählten Levomepromazin (10 Patienten), Perazin (1 Patient), Ranitidin (1 Patient) und Thioridazin (3 Patienten). Diese Studienteilnehmer erhielten mittlere Olanzapintagesdosen von 17,7mg. Ihre Medikamentenspiegel im Serum zeigten in Abhängigkeit von der Dosis Werte zwischen 1,0ng/ml und 6,9ng/ml. Der Mittelwert betrug 2,4ng/ml  $\pm 0,4$ . Diese Gruppe bestand aus 9 Männern und 6 Frauen, die alle bis zu 59 Jahre alt waren. Zwei der Patienten betrieben Nikotinabusus. Eine Person litt unter Arzneimittelnebenwirkungen, bei einer weiteren fehlten entsprechende Angaben.

Der Vergleich der Mittelwerte der korrigierten Serumspiegel von Patienten mit und ohne inhibierende Komedikation ergab einen p-Wert von 0,327 (Abbildung 16).





**Abbildung 16: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel bei Patienten mit und ohne inhibierende Komedikation (N=15 bzw. N= 130) (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

Drei Patienten nahmen sowohl Induktoren als auch Inhibitoren von CYP1A2 ein. Darunter befanden sich zwei, die mit Carbamazepin und Levomepromazin behandelt wurden und ein Patient, der Carbamazepin und Thioridazin einnahm. Ihnen wurde Olanzapin in Tagesdosen von durchschnittlich 15mg verabreicht. Der Mittelwert der dosiskorrigierten Serumspiegel lag bei 1,3ng/ml  $\pm$ 0,5. Unter den drei Patienten waren eine Frau und zwei Männer, von denen einer regelmäßig rauchte. Keiner von ihnen gab unter der Therapie Beschwerden an.

Zu den Patienten, deren Komedikation weder als CYP1A2-Induktor noch als CYP1A2-Inhibitor einzustufen war, zählten 66 Personen. Die verschiedenen Präparate sind in Tabelle 15 aufgeführt. Diese Patienten erhielten Olanzapin in durchschnittlichen Tagesdosen von 14,6mg. Die Serumspiegel des Medikaments lagen unter Berücksichtigung der Tagesdosis bei Werten zwischen 0,2ng/ml und 34,0ng/ml (Mittelwert: 4,1ng/ml  $\pm$ 0,7). Die Gruppe setzte sich zusammen aus 28 männlichen und 38 weiblichen Patienten. 8 von ihnen zählten zur Gruppe der Patienten, die 60 Jahre und älter waren. Bei 10 Personen fehlten Angaben zum Raucherstatus, 23 Personen rauchten regelmäßig. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden bei 5 Personen beschrieben (bei 13 Patienten keine Angaben zu diesem Merkmal).

53 Studienteilnehmer nahmen keine zusätzlichen Medikamente zu sich. Sie erhielten im Durchschnitt 16,5mg Olanzapin pro Tag. Die Serumspiegel lagen bei 2,5ng/ml (SEM  $\pm$ 0,2). Unter den Patienten, die nur Olanzapin einnahmen, waren 14 weibliche und 39 männliche Patienten, von ihnen waren vier 60 Jahre oder älter. 20 Personen waren Raucher. Eine Person litt unter therapieassoziierten Beschwerden (bei weiteren vier Patienten hierzu keine Angaben).

Bei einem Patienten fehlten Angaben zur Komedikation.

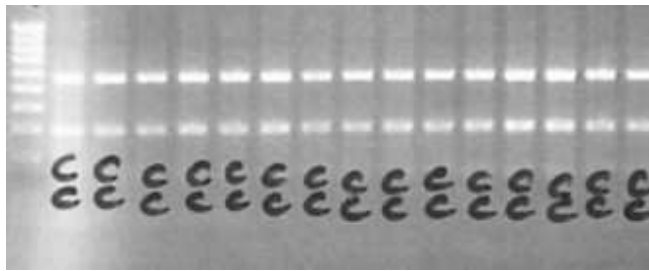
**Tabelle 15: Von den Patienten zusätzlich zu Olanzapin eingenommene Medikation**

<b>Zusatzmedikation (Psychopharmaka)</b>	<b>Anzahl (Gesamt:N=145)</b>	<b>Prozent</b>
<i>'Mood stabilizer'</i>		
Lithium	18	12,4
Valproinsäure, Lamotrigin, Carbamazepin	25	17,2
<i>Phenothiazine</i>		
Promethazin	10	6,9
Fluphenazin	4	2,8
Thioridazin	4	2,8
Levomepromazin	13	9,0
<i>Andere Neuroleptika</i>		
Risperidon	3	2,1
Haloperidol	11	7,6
Melperon	5	3,4
<i>Benzodiazepine</i>		
Diazepam	3	2,1
Lorazepam	19	13,1
Dikaliumchlorazepat	2	1,4
Clonazepam	1	0,7
Oxazepam	1	0,7
Zotepin, Zopiclon, Zolpidem	6	4,1
Biperiden	10	6,9
<i>SSRI (Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren)</i>		
Citalopram	4	2,8
Fluoxetin	1	0,7
Mirtazapin	1	0,7
Sertralin	3	2,1
Paroxetin	7	4,8
<i>Trizyklische Antidepressiva</i>		
Imipramin	1	0,7
Amitriptylin	6	4,1
Trimipramin	1	0,7
Opipramol	1	0,7
Doxepin	7	4,8
<b>Sonstige Medikation (nicht psychotrop)</b>		
Ja	57	39,3
Nein	53	36,6
Ohne Angaben	1	0,7

## 4.2 CYP1A2F21L-Variante

### 4.2.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

Die CYP1A2 F21L-Variante befindet sich im Exon 2 des CYP1A2-Gens. Ihre Häufigkeit wurde in einem *Mbo*II-RFLP-Assay untersucht. Dafür wurde zunächst ein PCR-Produkt von 982bp amplifiziert. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente mit errechneten Größen von 135bp, 293bp und 554bp (Wildtyp) auf Agarose-Gelen (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Agarose-Gel-Elektrophorese des *Mbo*II-Verdau. Das Bild zeigt exemplarisch den Genotyp CC bei 13 Patienten und den Größenstandard (Spur 1)

Für die Gesamtstichprobe wurde eine Frequenz von 1,0 für den Genotyp CC bestimmt, die Variante erwies sich damit in der untersuchten Ethnie als nicht polymorph.

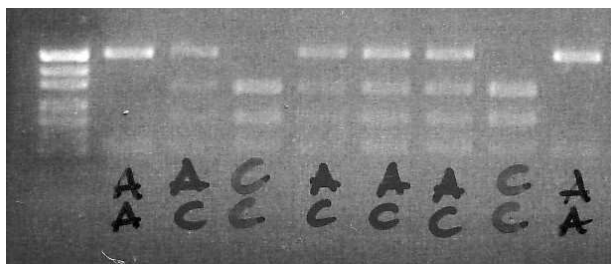
### 4.2.2 Olanzapinspiegel

Da das Kollektiv der Träger des C-Allels des F21L-Polymorphismus mit der Gesamtstichprobe übereinstimmt, gelten hier die für alle Patienten erhobenen Daten zum Olanzapinserumspiegel: 3,2ng/ml  $\pm$  0,31 (dosiskorrigiert). Für in einzelnen Teilkollektiven erzielte Resultate wird auf das vorhergehende Kapitel verwiesen.

## 4.3 CYP1A2\*1F-Polymorphismus

### 4.3.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

Der CYP1A2\*1F-Polymorphismus ist im Intron 1 lokalisiert. Zu seiner Untersuchung wurde ein 604bp langes Fragment amplifiziert, das dann einem Verdau mit *Bsu*RI zugeführt wurde. In der anschließenden Agarose-Gel-Elektrophorese zeigten sich Produkte von 111bp und 493bp (Genotyp AA) bzw. 111bp, 191bp und 302bp (Genotyp AC). Heterozygote Genträger (AC) waren durch 4 Banden zu identifizieren (111bp, 191bp, 302bp und 493bp, vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Agarose-Gel-Elektrophorese des *Bsu*RI-Verdau. Das Bild zeigt exemplarisch die Genotypen AA (Spur 2 und 9), AC (Spur 3, 5, 6 und 7) und CC (Spur 4 und 8) sowie den Größenstandard (Spur 1)

Die Typisierung des gesamten Patientenkollektivs ergab für den Genotyp AA eine Häufigkeit von 0,421, für AC 0,435 und für CC 0,145. Daraus errechnet sich für die Frequenz des Allels A ein Wert von 0,638 und für das Allel C von 0,362. Der  $\chi^2$ -Wert betrug 0,513, somit stimmt diese Verteilung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überein.

Betrachtet man Männer und Frauen getrennt, zeigen sich bei den Männern folgende Häufigkeiten der einzelnen Genotypen: AA: 0,402, AC: 0,427 und CC: 0,171. Die Frequenzen der Allele lagen dementsprechend bei A: 0,616 und C: 0,384. Auch hier ist mit einem  $\chi^2$ -Wert von 0,786 das Hardy-Weinberg-Äquilibrium erfüllt.

Bei den Frauen betrug die relative Häufigkeit des Genotyps AA und AC jeweils 0,444, die des Genotyps CC 0,112. Daraus ergaben sich Allelfrequenzen von 0,667 für A und 0,333 für C. Mit einem  $\chi^2$ -Wert von 0,000 genügte auch diese Verteilung dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

#### 4.3.2 Olanzapinspiegel

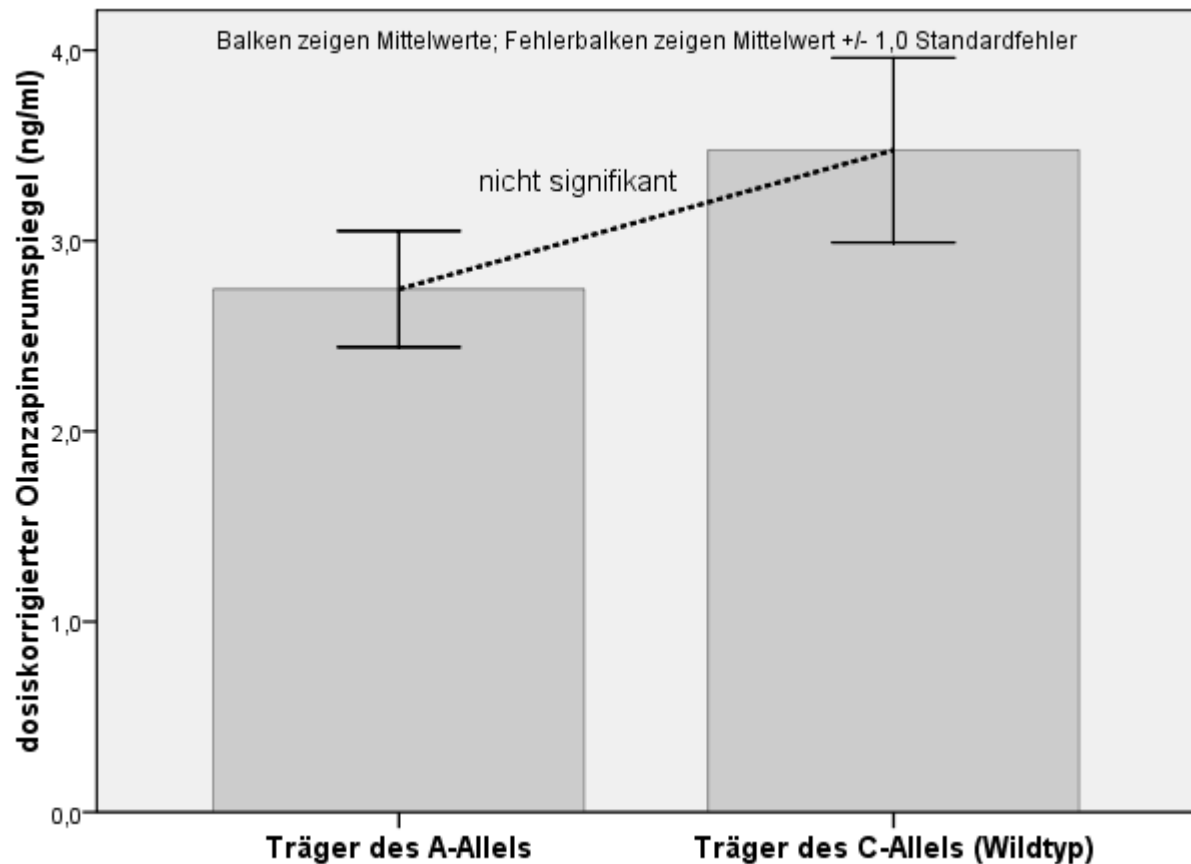
Der Mittelwert der Olanzapinserumspiegel bei den Patienten, die den Genotyp AA aufwiesen, lag dosiskorrigiert bei 2,7ng/ml ( $\pm 0,3$ ), mit einem Minimum von 0,2ng/ml und einem Höchstwert von 12,7ng/ml.

Nach Geschlechtern differenziert ergab sich für Frauen ein Wert von 3,7ng/ml  $\pm 0,6$  und für Männer von 1,9ng/ml  $\pm 0,2$ . Für Patienten mit der Genvariante AA, die 60 Jahre und älter waren, wurde ein Mittelwert von 3,8ng/ml  $\pm 0,7$  ermittelt. Bei den Rauchern lag dieser bei 2,0ng/ml  $\pm 0,2$ , während er bei den Personen, die Nebenwirkungen beklagten, 2,2ng/ml  $\pm 0,7$  erreichte.

Beim heterozygoten Patientenkollektiv (AC) wurden Serumspiegel zwischen 0,4ng/ml und 34,0ng/ml gemessen, im Mittel 3,8ng/ml  $\pm 0,6$  (SEM). Der Mittelwert für Frauen dieser Gruppe lag bei 4,9ng/ml  $\pm 1,4$ , für Männer bei 2,9ng/ml,  $\pm 0,3$ . Der Mittelwert für die Gruppe der Personen, die 60 Jahre und älter waren, lag bei 2,8ng/ml,  $\pm 0,7$ . Bei Rauchern wurden 2,5ng/ml  $\pm 0,3$  ermittelt. Für die Gruppe der Patienten, die an unerwünschten Arzneimittelwirkungen litten, ergab sich im Mittel ein Wert von 3,7ng/ml  $\pm 0,3$  und bei Patienten, die CYP1A2-induzierende Medikamente zu sich nahmen, von 1,2ng/ml  $\pm 0,5$ . Bei denjenigen Patienten, denen eine CYP1A2-inhibierende Komedikation verabreicht wurde, lag der Mittelwert der dosiskorrigierten Olanzapinkonzentration bei 2,7ng/ml  $\pm 0,6$ .

Für Patienten, die homozygot für das C-Allel waren, fand sich ein Spiegel von 2,6ng/ml  $\pm 0,4$ . Bei Frauen erreichte dieser 4,1ng/ml  $\pm 0,7$ , bei Männern 1,9ng/ml  $\pm 0,3$ . Bei Patienten ab 60 Jahre lag der dosiskorrigierte Serumspiegel im Mittel bei 3,3ng/ml (SEM:  $\pm 0,5$ ). Bei Rauchern betrug er 1,9ng/ml  $\pm 0,6$ . Der einzige Patient mit dem Genotyp CC, der unter Nebenwirkungen litt, wies einen Serumspiegel von 4,0ng/ml auf.

Bei C-homozygoten Patienten, die eine CYP1A2-inhibierende Komedikation einnahmen, ergab sich ein Mittelwert von 3,3ng/ml  $\pm 1,8$ . Bei einem einzelnen Patienten mit CYP1A2-induzierender Komedikation wurde nach Dosiskorrektur ein Wert von 3,8ng/ml festgehalten. Der Vergleich der Mittelwerte der korrigierten Serumspiegel von Trägern des C-Allels mit Trägern des Wildtyp-Allels ergab einen  $p$ -Wert von 0,245 (Abbildung 19).



**Abbildung 19: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel bei Trägern des Wildtyp-Allels (N=61) und Trägern des C-Allels (N=84) im Vergleich (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)**

#### 4.3.3 Funktionelle Charakterisierung des CYP1A2\*1F-Polymorphismus im Zellmodell

Zur Darstellung der funktionellen Bedeutung des CYP1A2\*1F-Polymorphismus *in vitro* diente die Lumineszenzreaktion der Glühwürmchen-Luziferase. Diese Methode erlaubt, im Zellmodell einen kontrollierten Vergleich der Genvarianten und eine Aussage zur biologischen Relevanz von Ergebnissen der Genotypisierung.

Mit der Cos-7-Zelllinie wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Bei den nicht stimulierten Proben betrug die relative Aktivität des Reportergens durchschnittlich 106,7% ( $\pm 11,6$ ) für das A-Allel und 113,8% ( $\pm 8,5$ ) für das C-Allel.

Bei Zellen, die mit PMA stimuliert worden waren, bewegten sich die Werte zwischen 25,1% ( $\pm 3,7$ ) (A-Allel) und 60,3% ( $\pm 36,6$ ) (C-Allel) der Negativkontrolle.

Der Vergleich der Mittelwerte der relativen Aktivität des Reportergens für das A-Allel mit der des C-Allels ergab mittels t-Test für ungepaarte Stichproben einen *p*-Wert von 0,633. Bei Zellen, die mit PMA stimuliert worden waren, lag der *p*-Wert des Vergleichs der Mittelwerte des A-Allels und des C-Allel bei 0,361.

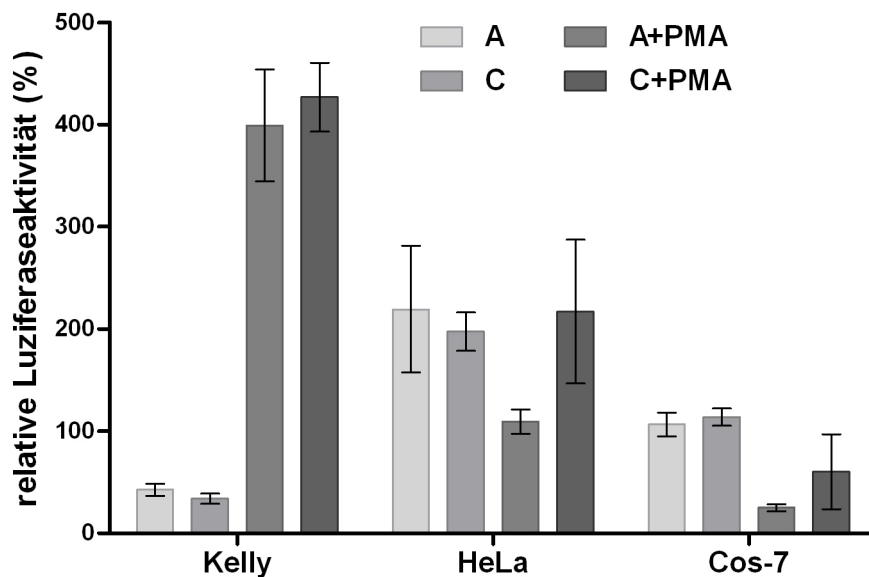
Mit der HeLa-Zelllinie ergab sich bei nicht-stimulierten Zellen eine relative Reportergen-Aktivität von 219,2% ( $\pm 61,7$ ) (A-Allel) bzw. 197,5% ( $\pm 19,0$ ) (C-Allel). Für stimulierte Proben ergab sich eine relative Aktivität von 109,3% ( $\pm 12,2$ ) (A-Allel) bzw. 217,0% ( $\pm 70,1$ ) (C-Allel) relativ zur Negativkontrolle.

Der Vergleich der Mittelwerte der relativen Aktivität des Reportergens für das A-Allel mit der des C-Allels ergab einen *p*-Wert von 0,744. Bei Zellen, die mit PMA stimuliert worden waren, lag der *p*-Wert des Vergleichs der Mittelwerte von A-Allel und C-Allel bei 0,161.

Mit Kelly-Zellen betrug die gemessene Aktivität ohne Stimulation 42,7% ( $\pm 6,0$ ) (Allel A) bzw. 34,0% ( $\pm 5,0$ ) (Allel C). Nach PMA-Gabe lag die Aktivität bei 399,1% ( $\pm 54,1$ ) (Allel A) bzw. bei 426,8% ( $\pm 33,7$ ) (Allel C) relativ zur Negativkontrolle.

Der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte der relativen Aktivität des Reportergens für das A-Allel mit der für das C-Allel ergab einen  $p$ -Wert von 0,290. Bei Zellen, die mit PMA stimuliert worden waren, lag der  $p$ -Wert des Vergleichs der Mittelwerte von A-Allel und C-Allel bei 0,676.

Abbildung 20 zeigt die relative Luziferaseaktivität im Vergleich differenziert nach Zelllinien.

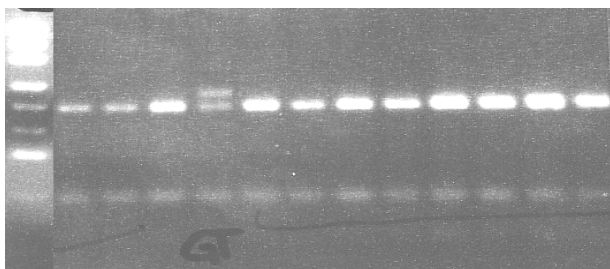


**Abbildung 20:** Vergleich der relativen Luziferaseaktivität bei nicht-stimulierten und mit PMA stimulierten Zellen, die das Allel A bzw. C exprimieren, differenziert nach Zelllinien

## 4.4 rs2069519-Polymorphismus

### 4.4.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

Der rs2069519-Polymorphismus befindet sich im Exon 1 des CYP1A2-Gens. Für die Restriktionsanalyse wurde ein DNA-Fragment von 227bp amplifiziert. Bei Vorliegen des Wildtyp-Allels (G) wurden durch Zugabe des Restriktionsenzym *DdeI* Produkte von 34bp und 193bp generiert. Bei Fehlen der Schnittstelle blieb das PCR-Produkt unverdaut (Allel T) (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Agarose-Gel-Elektrophorese des *DdeI*-Verdaus. Das Bild zeigt neben dem Größenstandard (Spur 1) exemplarisch die Genotypen GG (Spuren 2-4, 6-13) und GT (Spur 4)

Die relative Häufigkeit des Genotyps GG belief sich für die Gesamtstichprobe auf 0,959, die des Genotyps GT auf 0,041. Patienten mit Genotyp TT waren in der Stichprobe nicht enthalten.

Für das G-Allel wurde eine Frequenz von 0,979 ermittelt, für das Allel T eine Frequenz von 0,021. Diese Verteilung erfüllt mit einem  $\chi^2$ -Wert von 0,065 das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Differenzierung nach Geschlechtern ergab für den Genotyp GG relative Häufigkeiten von 0,963 (Männer) und 0,952 (Frauen), sowie für den Genotyp GT von 0,037 (Männer) bzw. 0,048 (Frauen). Die daraus errechneten Allelfrequenzen für das T-Allel lagen bei 0,018 (Männer) und 0,024 (Frauen). Für die Allelverteilung bei Männern und Frauen ergaben sich hier  $\chi^2$ -Werte von 0,028 bzw. 0,037, womit das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gewahrt bleibt.

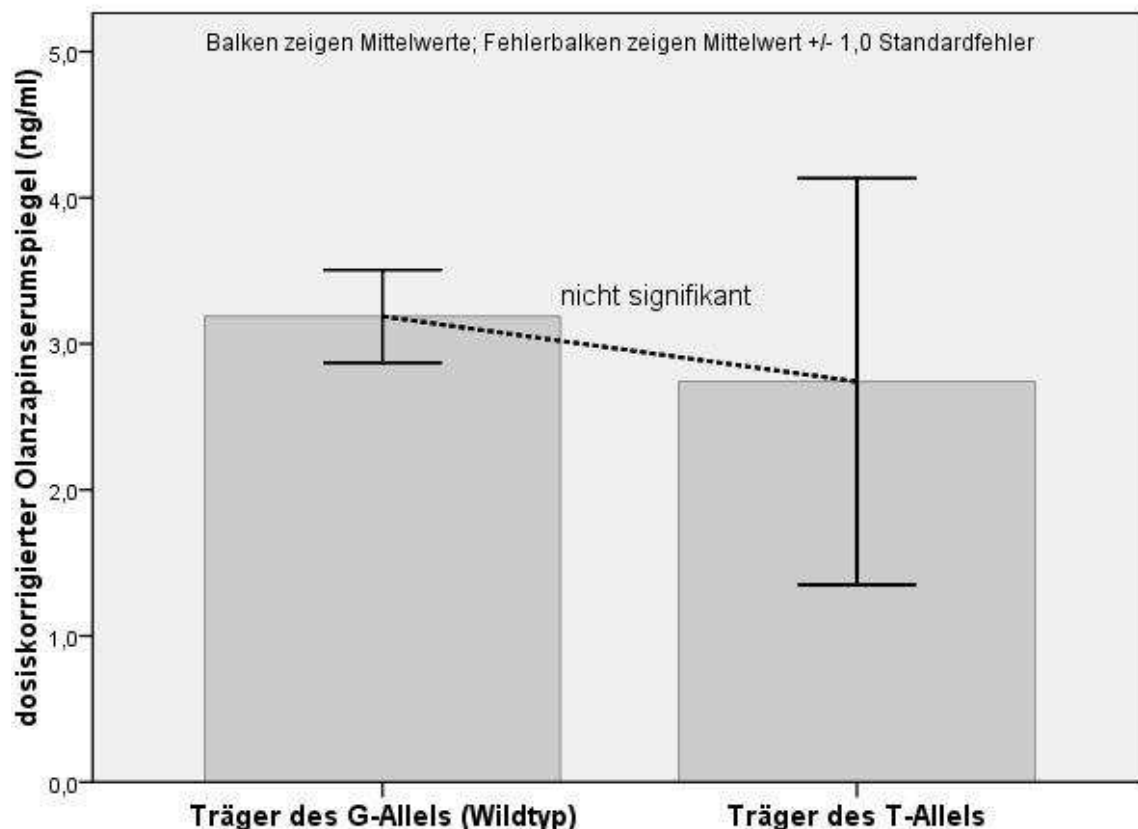


Abbildung 22: Serumspiegel bei Trägern der Genotypen GG (N=139) bzw. GT (N=6) (rs2069519-Polymorphismus)

#### 4.4.2 Olanzapinspiegel

Die Patienten mit Genotyp GG wiesen im Serum eine dosiskorrigierte Konzentration von durchschnittlich 3,2ng Olanzapin/ml  $\pm$ 0,3 auf. (Maximum: 34,0ng/ml, Minimum: 0,2ng/ml). Bei Frauen mit Genotyp GG lag der Serumspiegel dosiskorrigiert im Mittel bei 4,3ng/ml,  $\pm$ 0,68. Für Männer wurde ein Mittelwert von 2,4ng/ml  $\pm$ 0,2 ermittelt. Bezogen auf die Gruppe der Patienten ab 60 Jahren fanden sich Werte von 3,4ng/ml  $\pm$ 0,5. Für Raucher lag der Mittelwert bei 2,2ng/ml  $\pm$ 0,2. In der Gruppe der Patienten, die unter Nebenwirkungen litten, betrug der Durchschnittswert des Serumspiegels dosiskorrigiert 3,2ng/ml  $\pm$ 0,4. Patienten mit Genotyp GG, die Cytochrom-induzierende Komedikation eingenommen hatten, erreichten

einen durchschnittlichen dosiskorrigierten Olanzapinspiegel von 1,8ng/ml  $\pm$ 0,4. Wenn dagegen Cytochrom-inhibierende Medikamente eingenommen worden waren, lag der Wert bei 2,5ng/ml  $\pm$ 0,4.

Der Olanzapinserumspiegel heterozygoter Träger der rs2069519-Variante (GT-Genotyp) bewegte sich zwischen 0,3ng/ml und 9,2ng/ml. (Mittelwert 2,7ng/ml)

Wenn nach Geschlechtern differenziert wurde, erreichten Frauen einen Wert von 3,6ng/ml  $\pm$ 0,7 und Männern einen Wert von 1,9ng/ml  $\pm$ 1,0. Die Serumspiegel von Rauchern lagen bei 2,6ng/ml  $\pm$ 1,2. Ein Patient, der eine Cytochrom-inhibierende Komedikation erhalten hatte, wies einen Olanzapinserumspiegel von 28ng/ml auf (dosiskorrigierter Wert: 1,4ng/ml).

Der Vergleich der Mittelwerte der korrigierten Serumspiegel von Trägern des T-Allels mit den übrigen Patienten ergab einen p-Wert von 0,775 (Abbildung 22).

#### **4.5 Einfluss von mehreren Deskriptoren auf den Serumspiegel und auf Nebenwirkungen von Olanzapin**

Zur Beurteilung der Effekte mehrerer Deskriptoren auf das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen bzw. auf den Olanzapinspiegel wurde jeweils ein allgemeines lineares Modell herangezogen. Betrachtet wurden die Deskriptoren Geschlecht, Alter (<60 Jahre bzw.  $\geq$ 60 Jahre), Raucherstatus, Cytochrom-inhibierende und -induzierende Komedikation sowie der Trägerstatus für das seltenere Allel an den Positionen \*1F und rs2069519.

Ein erstes Regressionsmodell sollte das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen erklären. Der *p*-Wert des Modells erreichte bei Berücksichtigung aller genannten Einflussvariablen 0,442, dieses Ergebnis war also nicht signifikant.

Im Falle des zweiten Modells zur Vorhersage des dosiskorrigierten Olanzapinserumspiegels nahm *p* einen Wert von 0,001 an, womit für diese Berechnung eine Signifikanz gegeben war und eine Aussage über den Einfluss der Deskriptoren getroffen werden kann. Hier erklären die berücksichtigten Einflussvariablen 20% der Varianz ( $R^2 = 0,200$ )

Um zu differenzieren, welche Deskriptoren den größten Effekt auf den Olanzapinspiegel besaßen, wurden im nächsten Schritt (Modell 3) gezielt nur die Faktoren in das Modell aufgenommen, die in der ersten Berechnung einen signifikanten *p*-Wert erreicht hatten. Dies waren die Variablen 'Geschlecht' mit einem *p*-Wert von 0,005, 'Raucherstatus' (*p*= 0,050) und das Vorhandensein des T-Allels an Position rs2069519 (*p*=0,035). Auch dieses einfache Regressionsmodell war signifikant (*p*<0,001). Für  $R^2$  wurde ein Wert von 0,146 ermittelt.

Um den Effekt des genetischen Deskriptors einschätzen zu können, wurde im Weiteren ein Regressionsmodell (Modell 4) unter Ausschluss der Variable rs2069519-T berechnet (unabhängige Variablen: Geschlecht und Raucherstatus). Es ergab sich ein *p*-Wert von 0,001, womit das Modell signifikant war.  $R^2$  betrug hier noch 0,107.

Da sich die Deskriptoren in natura auch untereinander beeinflussen können, wurde abschließend ein statistisches Modell erstellt, das Interaktionen berücksichtigt (Modell 5). Auch hier wurden nur die Variablen betrachtet, deren Effekt auf die Höhe des Olanzapinspiegels signifikant war (Geschlechtszugehörigkeit, Raucherstatus, Allelstatus der rs2069519-Variante). Der *p*-Wert dieser Berechnung betrug <0,001. Sowohl für die Interaktion von Geschlecht und T-Allel an Position rs2069519 als auch für die Interaktion von T-Allel an Position rs2069519 und Raucherstatus ergaben sich signifikante Werte (*p*=0,042 bzw. *p*=0,005).  $R^2$  des Interaktionsmodells betrug 0,221.

Tabelle 16 gibt einen Überblick der beschriebenen Modelle.



**Tabelle 16: Überblick der den Berechnungen zugrunde liegenden statistischen Modelle**

Modell	Deskriptoren ( <i>p</i> -Wert)	Abhängige Variable	<i>p</i> -Wert des Modells	R <sup>2</sup>
1	Geschlecht ( <i>p</i> =0,052) Alter ( <i>p</i> =0,129) Raucher ( <i>p</i> =0,287) Induzierende Komedikation ( <i>p</i> =0,486) Inhibierende Komedikation ( <i>p</i> =0,747) Trägerstatus rs762551 ( <i>p</i> =0,719) Trägerstatus rs2069519 ( <i>p</i> = 0,507)	UAW	0,442	0,056
2	Geschlecht ( <b><i>p</i>=0,005</b> ) Alter ( <i>p</i> =0,258) Raucher ( <b><i>p</i>=0,050</b> ) UAW ( <i>p</i> =0,507) Induzierende Komedikation ( <i>p</i> =0,061) Inhibierende Komedikation ( <i>p</i> =0,806) Trägerstatus rs762551 ( <i>p</i> =0,106) Trägerstatus rs2069519 ( <b><i>p</i>= 0,035</b> )	Dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel	<b>0,001</b>	0,200
3	Geschlecht ( <b><i>p</i>=0,002</b> ) Raucher ( <b><i>p</i>=0,023</b> ) Trägerstatus rs2069519 ( <b><i>p</i>= 0,017</b> )	Dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel	<b>&lt;0,001</b>	0,146
4	Geschlecht ( <b><i>p</i>=0,003</b> ) Raucher ( <b><i>p</i>=0,026</b> )	Dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel	<b>0,001</b>	0,107
5	<b>Interaktionen:</b> Geschlecht - Trägerstatus rs2069519 ( <b><i>p</i>=0,042</b> )  Geschlecht - Raucher ( <i>p</i> =0,935)  Raucher - Trägerstatus rs2069519 ( <b><i>p</i>=0,005</b> )  Geschlecht - Raucher - Trägerstatus rs2069519 ( <i>p</i> =0,829)	Dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel	<b>&lt;0,001</b>	0,221
Signifikante Werte wurden fett hervorgehoben				

## 4.6 Haplotypen

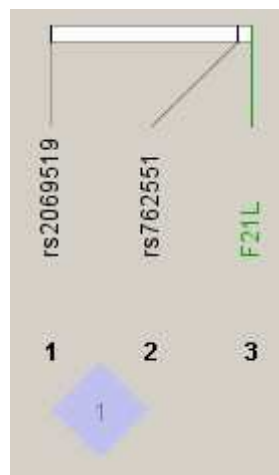
Bezogen auf die Kombinationen der beobachteten Allele von CYP1A2 F21L (C), CYP1A2\*1F (A oder C) und rs2069519 (G oder T) ergaben sich theoretisch vier mögliche Haplotypen aus 3 SNPs: GAC, GCC, TAC und TCC. Wegen des monomorphen C-Allels an der Position F21L ist das Spektrum der Allel-Kombinationen gegenüber anderen Kollektiven um vier reduziert (GAG, TAG, GCG, TCG). Beobachtet wurden in der Stichprobe nur drei Haplotypen: GAC, GCC und TAC.

Für den Haplotyp GAC lag die relative Häufigkeit im Gesamtkollektiv bei 0,617 (Männer: 0,600, Frauen: 0,643).

Für die Kombination GCC wurde eine relative Häufigkeit von 0,362 ermittelt (Männer: 0,382, Frauen: 0,333).

Der Haplotyp TAC war im Patientenkollektiv mit einer relativen Häufigkeit von 0,021 vertreten (Männer: 0,016, Frauen: 0,024).

Abbildung 23 stellt schematisch die physikalische Entfernung zwischen den untersuchten CYP1A2-Varianten dar. Darüber hinaus zeigt die Darstellung ein Maß der Kopplung ( $r^2 = 1$ , d.h., es besteht eine starke Kopplung) zwischen den beiden polymorphen Varianten rs2069519 und rs762551. Die Berechnung der Kopplung erfolgte mit Haploview 4.1 (Barrett et al., 2005).



**Abbildung 23: schematische Darstellung der physikalischen Entfernung zwischen den 3 untersuchten CYP1A2-Varianten sowie eines Maßes der Kopplung zwischen den beiden Varianten rs2069519 und rs762551**

## **5 Diskussion**

### **5.1 Serumspiegel von Olanzapin**

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Prävalenz und der Funktionalität von genetischen Varianten des CYP1A2-Enzyms unter Zuhilfenahme des Serumspiegels von Olanzapin sowie zusätzlicher klinischer Parameter.

Bei Olanzapintagesdosen zwischen 2,5mg und 35mg wurden Serumspiegel im Bereich von 2ng/ml bis 321ng/ml gemessen, sie variierten demnach um das 160-fache. Nach Anpassung der Olanzapinkonzentration an die Dosis reduzierte sich hier die Variabilität der Werte auf den Faktor 5 (0,9ng/ml – 4,5ng/ml).

In einer früheren Studie mit 71 schizophrenen Patienten (Bergemann et al., 2004) hatte sich bereits gezeigt, dass der Plasmaspiegel von Olanzapin bei Dosen zwischen 5mg/d und 40mg/d um den Faktor 170 variieren kann. Gex-Fabry und Mitarbeiter (2003) beschreiben bei einem Kollektiv von 250 Patienten unter Olanzapinbehandlung mit 2,5mg/d bis 30mg/d eine Variabilität der gemessenen Plasmaspiegelwerte um den Faktor 76, wobei 90% der Werte zwischen 8ng/ml und 64ng/ml lagen. Insgesamt lagen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Serumspiegel bei vergleichbaren Tagesdosen geringfügig höher als bei Gex-Fabry et al.. Da die Patientenkollektive gut vergleichbar waren, können als Ursache hierfür Unterschiede in den Bestimmungsv erfahren der Medikamentenkonzentration in Betracht gezogen werden. So wurde bei Gex-Fabry et al. die Olanzapinmenge im Plasma, in der vorliegenden Arbeit hingegen im Serum ermittelt. Hinzu kommen mögliche Interaktionen durch Nahrungsmittel wie Kaffee oder Grapefruitsaft, deren Verzehr nicht protokolliert wurde.

Letztlich existieren keine Referenzwerte für die dosisabhängig zu erwartende Plasmakonzentration (Chue und Singer, 2003), obwohl es eine Empfehlung zur Höhe der zu verabreichenden Olanzapintagesdosis gibt. Pharmakokinetische Studien bei gesunden Probanden zeigen, dass Clearancewerte interindividuell um den Faktor 4 schwanken können (Callaghan et al., 1999). Dies wurde für Olanzapinserumspiegel durch eine Studie mit Werten aus einem TDM-Programm (Olesen und Linnet, 1999) und den Ergebnissen der Arbeit von Gex-Fabry et al. (2003) bestätigt.

#### **5.1.1 Bezug zum therapeutischen Bereich**

Zur objektiven Beurteilung der Wirksamkeit eines Medikaments wird der so genannte therapeutische Bereich herangezogen. Dieser definiert die Serumkonzentration, bei der eine therapeutische Wirkung des Medikaments erwartet wird und unerwünschte Wirkungen nicht ins Gewicht fallen. Er dient also dazu, Unterdosierungen und folglich Therapieversagen bzw. Überdosierungen mit potentiell toxischen Nebenwirkungen zu vermeiden und geht zurück auf Erkenntnisse des Therapeutic Drug Monitoring.

Von Rao et al. (2001) wird ein optimaler therapeutischer Bereich des Olanzapinspiegels in Serum oder Plasma von 20ng/ml bis 40ng/ml postuliert.

Bei etwa einem Drittel der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Patienten (36,6%) lag der Olanzapinserumspiegel in diesem Bereich. Die Tagesdosen dieser Gruppe unterschieden sich nicht von denen des Gesamtkollektivs (Median in beiden Fällen 15mg/d), jedoch zeigten sich in der Zusammensetzung der Gruppen einige Unterschiede.

So fanden sich in der Gruppe der Patienten mit einem Olanzapinspiegel unterhalb des therapeutischen Bereichs mit 45,2% mehr Raucher als in den Gruppen mit einem Serumspiegel innerhalb bzw. oberhalb des therapeutischen Bereiches (30,2% bzw. 30,0%). Der Befund repliziert Beobachtungen von Desai et al. (2001) zu herabgesetzten

Plasmaspiegeln von Olanzapin bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern. Für die Praxis ist daraus abzuleiten, dass Raucher durchschnittlich eine höhere Tagesdosis Olanzapin benötigen, um den Serum- bzw. Plasmaspiegel im therapeutischen Bereich zu halten.

Diejenigen Patienten, deren Olanzapinspiegel oberhalb des empfohlenen Bereichs lagen, nahmen im Mittel eine höhere Dosis des Medikaments (Median 20mg/d) im Vergleich zu Patienten mit Olanzapinspiegeln innerhalb bzw. unterhalb des therapeutischen Bereichs (Median 15mg/d bzw. 10mg/d) ein. Hier ist in der Praxis abzuwägen, ob im Einzelfall eine Dosissteigerung den gewünschten therapeutischen Erfolg erzielen kann oder ob eine alternative Therapie ins Auge zu fassen ist.

Hinsichtlich des Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) berichteten insgesamt 8 Patienten (5,5%) von Beschwerden. Bei diesen Patienten wurde in drei Fällen (37,5% der Patienten, die UAW angaben) ein Olanzapinspiegel über dem Normbereich, in 4 Fällen (50%) ein Olanzapinspiegel innerhalb des Normbereichs und in einem Fall (12,5%) ein Olanzapinspiegel unter dem Normbereich gemessen. Rechnerisch ergibt sich somit kein Hinweis für eine Abhängigkeit des Auftretens unerwünschter Arzneimittelwirkungen von der Höhe des Olanzapinspiegels. Die Art der UAW wurde bei der Datenerfassung nicht spezifiziert.

Während Callaghan et al. (1999) gezeigt hatten, dass bei älteren Patienten aufgrund eines verlangsamten oxidativen Metabolismus höhere Olanzapinspiegel gemessen werden, ergaben sich aktuell in der Altersgruppe ab 60 Jahren keine durchgehend erhöhten Olanzapinserumspiegel: Die Gruppe der Patienten, deren Serumkonzentration über dem therapeutischen Bereich lag, umfasste 4 Personen (8,3%) mit 60 Jahren oder älter, ebenso wie die Gruppe, deren Serumkonzentration unterhalb des therapeutischen Bereichs lag (7,5%). In der Gruppe der Patienten mit Olanzapinspiegeln innerhalb des therapeutischen Bereichs befanden sich 6 Personen im Alter von 60 Jahren oder mehr (14,2%).

### **5.1.2 Prädiktoren des Olanzapinspiegels**

Der Metabolismus von Medikamenten unterliegt mitunter großen interindividuellen Schwankungen, die auf zahlreiche Einzelfaktoren wie z. B. Alter, Geschlecht, Gewicht, Leber- und Nierenfunktion zurückgeführt werden können.

Bezogen auf den Olanzapinstoffwechsel ist bekannt, dass neben der Dosis des Medikaments vor allem Geschlecht, Raucherstatus und Alter die Höhe der Serum- bzw. Plasmakonzentration beeinflussen (Desai et al., 2001, Kelly et al., 1999, Callaghan et al., 1999, Skogh et al., 2002). So weisen Frauen und ältere Personen eine eingeschränkte Clearance auf, von Rauchern dagegen wird Olanzapin rascher abgebaut.

Unter Ausschluss anderer Einflussvariablen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter geschlechtsabhängiger Unterschied zwischen dem mittleren dosiskorrigierten Olanzapinserumspiegel von 4,3ng/ml bei Frauen und 2,3ng/ml bei Männern ( $p=0,002$ , t-Test für unabhängige Stichproben). In der Regressionsanalyse bestätigte sich dieser Effekt ( $p=0,005$ ). Ergebnisse einer früheren Untersuchung von Bergemann et al. (2004), die keinen Zusammenhang zwischen Geschlechtszugehörigkeit und der Höhe des Olanzapinspiegels hatte erkennen lassen, waren von den Autoren auf die geringe Probandenanzahl ( $N=71$ ) zurückgeführt worden. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit hatten die weiblichen Patienten dieser Studie jedoch wesentlich geringere Olanzapindosen eingenommen, so dass unter Umständen Unterschiede im Metabolismus des Pharmakons bei ihnen weniger deutlich geworden sein mögen. In der vorliegenden Studie differierte die Olanzapindosierung bei Männern (15,9mg/d) und Frauen (15,1mg/d) nur unwesentlich.

Wenige Arbeiten vergleichen Plasma- bzw. Serumspiegel unter Berücksichtigung weiterer Einflussvariablen. Zu letzteren zählen die Resultate von Gex-Fabry et al. (2003), die mittels

Regressionsanalyse erzielt wurden und eine um 60% höhere Olanzapinplasmakonzentration für ältere, nichtrauchende Frauen ergaben. In dieser Studie war die Olanzapindosis für die statistische Analyse auf 15mg/d normiert worden, die Medikamentenkonzentration war 12 Stunden nach Einnahme gemessen worden. Genetische Einflussgrößen wurden nicht untersucht. Ob bereits die zusätzliche Einbeziehung der genetischen Komponente geschlechtsspezifische Unterschiede zu relativieren vermag, muss in weiteren Studien ermittelt werden.

Bezogen auf den Raucherstatus ergaben sich in der vorliegenden Untersuchung in ähnlicher Weise signifikant niedrigere Serumspiegel für Raucher (Mittelwert von 2,2ng/ml dosiskorrigiert) gegenüber Nichtrauchern (3,8ng/ml) bei Anwendung eines t-Tests ( $p=0,022$ ). In der Varianzanalyse war der Raucherstatus per se ebenfalls bedeutsam ( $p=0,050$ ). Dies bestätigt die Ergebnisse von Callaghan et al. (1999), deren Studie einen deutlichen Einfluss von Raucherstatus und Geschlechtszugehörigkeit auf die Pharmakokinetik von Olanzapin postuliert. Auch Skogh und Mitarbeiter (2002) beschreiben diesen Effekt in einer TDM-Studie mit 194 Patienten. Demzufolge sollten Patienten, die Nikotinabusus betreiben unter Olanzapinmedikation per TDM überwacht werden, um Unterdosierungen zu vermeiden.

Eine untergeordnete Rolle spielte der Einfluss des Lebensalters, der weder im direkten Vergleich der Mittelwerte der Olanzapinserumspiegel noch in der Varianzanalyse ein signifikantes Ergebnis lieferte ( $p=0,594$  bzw.  $p=0,258$ ). Dazu ist anzumerken, dass die Anzahl der älteren Patienten mit 14 Personen (9,7%) vergleichsweise gering war.

Auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen erwiesen sich als schwacher Prädiktor im direkten Vergleich der Olanzapinserumspiegel ( $p=0,758$ ). Hier mögen Studien mit größerer Teilnehmerzahl eine genauere Bewertung ermöglichen.

Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich bei Patienten, die eine cytochrom-induzierende Komedikation einnahmen ein signifikant niedrigerer dosiskorrigierter Serumspiegel von 1,7ng/ml gegenüber 3,3ng/ml bei Patienten, denen keine induzierende Komedikation verabreicht wurde. Dies bestätigt frühere Ergebnisse für Carbamazepin (Parker et al., 1998) bzw. Omeprazol (Frick et al., 2003).

Bei Berücksichtigung aller untersuchten Einflussvariablen konnten 20% der Varianz des Olanzapinspiegels erklärt werden ( $p=0,001$ ). Unter Ausschluss der nicht signifikanten Prädiktoren (Alter, inhibierende oder induzierende Komedikation, Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie rs762551-Variante) konnten durch Geschlechtszugehörigkeit, Raucherstatus und die rs2069519-Variante noch 14,9% der Varianz erklärt werden ( $p<0,001$ ).

Anhand der Variablen Geschlecht, Alter, Raucherstatus, induzierende bzw. inhibierende Komedikation und der Ausprägungen der CYP1A2-Varianten rs2069519 und rs762551 war dagegen das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen mit Hilfe einer Regressionsanalyse nicht vorherzusagen ( $p=0,442$ ). Der Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen Serumspiegels und dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist jedoch durch mehrere Studien belegt (Perry et al., 2005; Rao et al., 2001). Hier liegt möglicherweise eine Verfälschung durch die geringe Anzahl der Patienten vor, die Nebenwirkungen angegeben hatten.

In der Zusammenschau sind die von den anderen Studien abweichenden Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Daten dort ohne die Einbeziehung anderer Variablen bewertet wurden. Noch herrscht ein Mangel an Untersuchungen, die Interaktionen der verschiedenen inzwischen bekannten Einflussfaktoren berücksichtigen und komplexe Ursachenmodelle favorisieren.

### 5.1.3 Interaktionsmodelle

Zur Darstellung von Interaktionen der einzelnen Prädiktoren und für eine differenzierte Aussage zu den vorliegenden Daten diene ebenfalls ein Regressionmodell.

Da nur der Einfluss der Variablen Geschlechtszugehörigkeit, Raucherstatus und T-Allel-Trägerstatus an Position rs2069519 statistisch signifikant war, wurden lediglich diese Prädiktoren im Interaktionsmodell berücksichtigt. Insgesamt können hiermit 22,1% der Varianz des Olanzapinspiegels erklärt werden ( $p < 0,001$ ), wobei die Interaktionen zwischen Raucherstatus und T-Allel-Trägerstatus sowie Geschlechtszugehörigkeit und T-Allel-Trägerstatus signifikante  $p$ -Werte ergaben (0,005 bzw. 0,042).

Damit ergeben sich aus der Auswertung der Daten keine Hinweise auf einen nennenswerten Effekt von CYP1A2-induzierender oder -inhibierender Medikation im Gegensatz zu Vorbefunden von Olesen et al. (1999) und Callaghan et al (1999). Dies kann auf die geringe Anzahl der Patienten zurückgeführt werden, die CYP1A2-induzierende oder -inhibierende Komedikation einnahmen oder auf die Untergliederung der Medikamentengruppen.

Auch eine Beeinflussung der Olanzapinkonzentration durch das Lebensalter wie von Weiss et al. (2005) postuliert, konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. In der genannten Untersuchung wurden die Olanzapinplasmaspiegel verglichen, nachdem die Patienten nach Altersdekaden zusammengefasst worden waren. Dieses Vorgehen weicht von der Definition des höheren Lebensalters in der vorliegenden Arbeit ab.

Insgesamt mangelt es in der Literatur an validen Daten zu Interaktionen individueller Einflussfaktoren auf die Höhe des Olanzapinspiegels. Da diese für die Praxis einen großen Stellenwert besitzen, sind weitere Studien auch unter Berücksichtigung der genetischen Komponenten anzuregen.

## 5.2 Einfluss von Cytochrom P450 1A2- Polymorphismen auf den Olanzapin-Metabolismus

Es ist bekannt, dass die Wirkung eines Medikamentes durch genetische Variabilität hinsichtlich der Absorption, Metabolisierung, Ausscheidung und Wirkung am Erfolgsorgan beeinflusst werden kann (Rietschel, 2001). Kenntnisse über den funktionellen Einfluss von Cytochrom P450 1A2-Varianten sind entscheidend für die klinische Anwendung zahlreicher Medikamente einschließlich Olanzapin. Einer Enzyminduktion bzw. -inhibition, die dazu führt, dass die Serum- bzw. Plasmakonzentration den therapeutischen Wirkspiegel unter- oder überschreitet, kann durch Anpassung der Dosis entgegengetreten werden (Meisel et al, 2003). Bei nachgewiesener Relevanz einer genetischen Veränderung eröffnet sich damit die Möglichkeit, schon im Vorfeld einer medikamentösen Therapie eine gezielte Genotypisierung durchzuführen. Günstigstenfalls könnte so das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen durch Überdosierung minimiert sowie ein mangelhaftes Therapieansprechen durch Underdosierung zugunsten von Behandlungsergebnis und Lebensqualität der Patienten vermieden werden (Dahl, 2002).

Es ist geschätzt worden, dass interindividuelle Unterschiede der CYP1A2-Aktivität eine Erbllichkeit von 0,725 aufweisen (Rasmussen et al., 2002). Dennoch dürfen bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung einer Genvariante andere, auf den gleichen Mechanismus Einfluss nehmende Faktoren wie Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Komedikation nicht vernachlässigt werden (Meisel et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden all diese Faktoren berücksichtigt. Erfasst wurden die Auswirkungen dreier Genvarianten des Leberenzym Cytochrom P 450 1A2 auf den Serumspiegel von Olanzapin unter naturalistischen Bedingungen. Durch die zusätzliche funktionelle Charakterisierung des CYP1A2 \*1F-Polymorphismus in einem Zellmodell wurde der Einfluss genetischer Variablen

auch in vitro geprüft.

### **5.2.1 CYP1A2F21L-Variante**

Die CYP1A2F21L-Variante bewirkt einen Aminosäureaustausch von Phe<sub>21</sub> zu Leu<sub>21</sub> durch einen Basenaustausch von Cytosin zu Guanin an Position 2866 in Exon 2 (Huang et al., 1999).

#### **5.2.1.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen**

Im Kollektiv der Erstbeschreiber fanden sich unter 165 Personen nur zwei, die heterozygot für die F21L-Variante waren. Bei der Genotypisierung einer weiteren Stichprobe von 202 Personen unterschiedlicher ethnischer Herkunft (dbSNP) ergab sich für das G-Allel eine Häufigkeit von 0,005 und für das C-Allel von 0,995. Wurde nur das kaukasische Teilkollektiv (n=30) betrachtet, so fand sich für das C-Allel eine relative Häufigkeit von 1,000. Das gleiche Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit erzielt.

Im Referenzkollektiv (dbSNP) befanden sich neben 30 Kaukasiern 23 Personen spanischer Abstammung, 24 Personen pakistanischer Herkunft und 24 Personen afrikanischer Abstammung. Bei diesen Gruppen waren nur im afrikanischen Teilkollektiv Personen mit dem Allel G anzutreffen (Frequenz 0,021). Homozygote Träger der Mutation wurden nicht gefunden.

#### **5.2.1.2 Auswirkung auf den Olanzapinspiegel**

Da im eigenen Patientenkollektiv keine Träger des G-Allels gefunden wurden, wurde auf eine Untersuchung der funktionellen Auswirkungen des Polymorphismus verzichtet. Bei dem von Huang et al. beschriebenen chinesischen Träger der Mutation soll eine erhöhte Stoffwechselrate im Koffein-Atem-Test beobachtet worden sein. Inwieweit der Phänotyp tatsächlich auf diese Variante zurückgeht, bleibt gegenwärtig spekulativ. Für aussagekräftige Studien bedarf es eine Phänotypisierung größerer Kollektive oder eines familienbasierten Ansatzes.

### **5.2.2 CYP1A2\*1F (rs762551) -Polymorphismus**

1998 beschrieben Chida et al. den CYP1A2\*1F-Polymorphismus in einem japanischen Kollektiv. Es handelt sich um einen Basenaustausch von C zu A im Bereich des Intron 1 (-163C>A).

#### **5.2.2.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen**

Eine Reihe von publizierten Assoziationsstudien liefern Referenzwerte zur Prävalenz des \*1F-Polymorphismus: Chida et al. konstatierten in ihrer Stichprobe von 157 Japanern für das A-Allel eine Häufigkeit von 0,613. Sachse et al. (1999) beschrieben in einer Studie mit 236 kaukasischen Probanden eine relative Häufigkeit von 0,32 für Allel C und von 0,68 für Allel A. Diese Zahlen stimmen mit den von Christiansen et al. 2001 veröffentlichten Ergebnissen überein (f(A)=0,68 bzw. f(C)=0,32). Auch die von Basile et al. (2000) und Han et al. (2001) untersuchten Kollektive kanadischer bzw. chinesischer Herkunft wiesen vergleichbare Zahlen auf: f(A)=0,62, f(C)=0,38 bzw. f(A)=0,67 und f(C)=0,33. Nordmark et al. beschrieben 2002 in einem Kollektiv von 1170 Schwedinnen eine relative Häufigkeit des A-Allels von 0,71 bzw. von 0,29 für das C-Allel. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Häufigkeiten (f(A)=0,62 und f(C)=0,38) decken sich mit diesen Daten. Auch bei den Genotypverteilungen zeigen sich keine größeren Abweichungen: So lag die Genotypverteilung bei Sachse et al. (2003) bei 0,1 für den Genotyp CC, 0,44 für AA und 0,46 für AC (eigene Stichprobe CC 0,145, AA 0,421 und AC 0,435). Diese Zahlen stehen im Einklang mit dem Hardy-Weinberg-

Gleichgewicht.

#### 5.2.2.2 Auswirkung auf den Olanzapinspiegel

MacLeod et al. wiesen 1999 darauf hin, dass der CYP1A2\*1F-Polymorphismus die Induzierbarkeit des Cytochroms beeinflusse und spekulierten, dass dem eine veränderte Bindung aktivitätsregulierender Proteine an das Gen zugrunde liege. Sollte der Polymorphismus selbst nicht funktionell sein, wäre auch denkbar, dass ein Kopplungsungleichgewicht die Assoziation mit metabolischen Phänotypen erklärt, die eigentlich auf Mutationen an anderer Stelle zurückgeht (Sachse et al., 1999). Die Annahme der gesteigerten CYP1A2-Induzierbarkeit bei Vorliegen des A-Allels wurde von den Autoren mittels eines Koffein-Tests geprüft. Aus der erhöhten Konzentration von Koffeinabbauprodukten bei Rauchern mit Genotyp AA im Vergleich zu Rauchern mit Genotyp AC oder CC wurde auf eine funktionelle Relevanz geschlossen. Demnach wären bei Trägern des Genotyps AA auch erniedrigte Olanzapinspiegel im Vergleich zu Trägern der beiden anderen Genotypen anzunehmen. Auch die Daten von Christiansen et al. (2000) sprächen für ein solches Ergebnis. In der Arbeit von Lurie et al. (2005) wird ebenfalls hervorgehoben, dass Patienten, die homozygot für Genotyp AA sind, niedrigere Serumspiegel des CYP1A2-Substrats Östrogen aufweisen. Andere Studien (Nordmark et al., 2002, Aklillu et al., 2003) widersprechen dagegen einer durch den Genotyp AA gesteigerten Enzymaktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine höhere Induktibilität durch den Genotyp AA weder im statistischen Zusammenhang mit dosiskorrigierten Serumspiegeln von Olanzapin noch im Zellversuch gezeigt werden. Patienten mit diesem Genotyp wiesen im Durchschnitt Olanzapinspiegel von 2,8ng/ml ( $\pm 0,3$ ) auf. Verglichen mit Patienten der beiden anderen Genotypen (AC: 3,8ng/ml  $\pm 0,6$  bzw. CC: 2,6ng/ml  $\pm 0,4$ ) zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied ( $p=0,245$ ). Auch in der Regressionsanalyse konnte keine Beeinflussung des Serumspiegels durch den \*1F-Polymorphismus nachgewiesen werden ( $p=0,106$ ), wie von Sachse et al. (1999) postuliert.

Diese gegensätzlichen Befunde mögen teilweise auf unterschiedliche Stichprobengrößen zurückgehen. Auch differieren die Kollektive in ihrer Zusammensetzung: Die Probandengruppe von Nordmark et al. (2002) umfasste 1170 schwedische Schwangere, während Sachse et al. (1999) 236 kaukasische Freiwillige beider Geschlechter untersuchte. Das Kollektiv von Han et al. (2001) umfasste 168 gesunde Chinesen beider Geschlechter, Lurie et al. (2005) dagegen untersuchten 220 Patientinnen aus Hawaii mit der Diagnose Mammakarzinom. Das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit umfasste 145 Männer und Frauen kaukasischer Herkunft mit der Diagnose Schizophrenie.

Zusätzlich ergeben sich Differenzen in den Parametern, die zur Berechnung der Enzymaktivität herangezogen wurden. Sachse et al. (1999), Nordmark et al. (2002), und Han et al. (2001) nutzten Abbauprodukte von Koffein als Marker, wobei weder die Verabreichungsform noch die Analysemethoden einheitlichen Protokollen folgten.

Zudem wurde in Studien, die eine erhöhte Enzymaktivität mit dem Genotyp AA in Verbindung bringen, neben den Daten zu Genotyp und Metabolitenumsatz allenfalls eine geringe Zahl zusätzlicher Einflussfaktoren berücksichtigt. Dies waren bei den drei genannten Studien lediglich der Raucherstatus sowie bei Nordmark et al. (2002) zusätzlich Koffeinkonsum.

Gegen eine funktionelle Relevanz des CYP1A2\*1F-Polymorphismus spricht u.a. auch eine fehlende Einflussnahme auf das Auftreten tardiver Dyskinesien (Schulze et al., 2001, Chong et al., 2003, Matsumoto et al., 2004, Tiwari et al., 2005, Boke et al., 2007) bzw. auf den Plasmaspiegel von Haloperidol (Shimoda et al., 2002)



### 5.2.2.3 Funktionelle Bedeutung des CYP1A2\*1F-Polymorphismus

Zur objektiven Bewertung funktioneller Effekte wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellversuch mit beiden Allelen des CYP1A2\*1F-Polymorphismus unter Verwendung dreier Zelllinien (Cos-7, HeLa, Kelly) durchgeführt. Dieses Experiment erbrachte bei keiner der Zelllinien einen signifikanten Unterschied zwischen der Expressionsstärke des Reportergens für Zellen, die mit Allel A bzw. C transfiziert wurden. (Cos-7:  $p=0,633$ , HeLa:  $p=0,744$  bzw. Kelly:  $p=0,290$ ). Auch die Stimulation mit PMA zeigte keine signifikante Differenz zwischen den Expressionsstärken der beiden Allele auf ( $p$ -Werte für Cos-7: 0,361, HeLa: 0,161 bzw. Kelly: 0,676).

Die ebenfalls negativen Ergebnisse von Aklillu et al. (2003) an einer weiteren Zelllinie unterstützen diese Resultate. Damit wird kausalen Zusammenhängen zwischen dem CYP1A2\*1F Allelträgerstatus und den Ergebnissen von Koffeinmetabolismusstudien (Sachse et al., 1999) widersprochen. Tatsächlich wurde ein solcher Zusammenhang von den Autoren kürzlich relativiert, nachdem eine Assoziation im Koffeinmetabolismus-Test nicht hatte repliziert werden können (Sachse et al., 2003).

### 5.2.3 rs2069519-Polymorphismus

Aitchison et al. identifizierten im Jahr 2000 drei Polymorphismen im 5'-Bereich des CYP1A2-Gens, darunter den rs2069519-Polymorphismus. Er bezieht sich auf einen Basenaustausch von Guanin zu Thymin an Position -3595.

#### 5.2.3.1 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

Die Erstbeschreiber des rs2069519-Polymorphismus führten an einem Kollektiv von 87 Kaukasiern, 104 Afroamerikanern und 125 Personen taiwanesischer Herkunft eine Untersuchung zur Häufigkeit dieser Genvariante durch. Dabei zeigten sich unter Kaukasiern bei einer Allelfrequenz von 0,025 für das seltene Allel (T) und 0,975 für den Wildtyp (G) ausschließlich heterozygote Träger der Variante (0,0345). Die Verteilung der Genotypen befand sich in Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Die Ergebnisse decken sich mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultaten ( $f(G)=0,979$ ,  $f(T)=0,021$ ;  $f(GG)=0,959$ ,  $f(GT)=0,041$ ,  $f(TT)=0,000$ ).

In einer nicht näher definierten Stichprobe von 87 Personen von der University of Utah (dbSNP) ( $f(G)=0,914$  und  $f(T)=0,086$ ) lag die relative Häufigkeit der Wildtyp-Homozygoten bei 0,839, die der Heterozygoten bei 0,149 und die der Homozygoten für die Genvariante TT bei 0,011. Hier wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht jedoch nicht erfüllt.

#### 5.2.3.2 Auswirkung auf den Olanzapinspiegel

Bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Polymorphismus durch Aitchison et al. (2000) zeigte sich eine signifikant höhere Basisaktivität des seltenen Allels gegenüber dem Wildtyp auf die Genexpression. In die Region des Basentausches fällt eine Bindungsstelle des CCAAT/Enhancer-Bindungsproteins  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ). Dieses gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem eine entscheidende Rolle in der Regulation leberspezifischer Gene spielen (Croniger et al., 1998). Damit liefert die Bindungsstelle zugleich ein Erklärungsmodell für die gesteigerte Expression von CYP1A2 in vitro. Da die Variante circa 8,4kb 3' des Bereiches liegt, den Ueda et al. (2006) untersucht haben, können diese Ergebnisse nicht zur Interpretation beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde im direkten Vergleich mittels t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Olanzapinspiegeln der beiden Allelträgergruppen gefunden ( $p=0,775$ ). Die Zahl der Heterozygoten könnte mit sechs Personen zu gering gewesen sein, um Effekte auf den Phänotyp abzubilden. Jedoch zeigte sich bei gleichzeitiger

Berücksichtigung des Raucherstatus und der Geschlechtszugehörigkeit in der Regressionsanalyse ein signifikanter Einfluss auf die Höhe des Olanzapinspiegels bei Vorliegen des T-Allels ( $p=0,035$ ). Auch bei der Untersuchung der Interaktionen unterschiedlicher Einflussgrößen (Raucherstatus, Geschlechtszugehörigkeit und T-Allel-Trägerstatus) auf den Olanzapinspiegel ergaben sich Hinweise auf einen signifikanten Effekt dieser Genvariante. Es bedarf weiterer Studien, die eine größere Anzahl von Trägern des T-Allels einschließen, um funktionelle Effekte dieses Polymorphismus aufzuklären, unter besonderer Beachtung der Einflussfaktoren Raucherstatus und Geschlecht.

### 5.3 Haplotypen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Berechnung von Haplotypen des CYP1A2-Gens aus Kombinationen der Varianten CYP1A2F21L, rs2069519 und rs762551 durchgeführt.

Akllilu et al. (2003) untersuchten die Haplotypen CYP1A2\*1J und CYP1A2\*1K bei Probanden aus Saudi-Arabien und Spanien. Hierbei stellt Haplotyp CYP1A2\*1J eine Kombination dar aus den Genvarianten -739T>G und -163C>A. Haplotyp CYP1A2\*1K weist zusätzlich zu diesen einen Basenaustausch an der Position -729C>T auf. Somit enthalten diese Haplotypen den hier ebenfalls untersuchten Polymorphismus rs762551 (-163C>A). Die Autoren beschreiben bei heterozygoten Trägern mit Nikotinabusus eine verminderte Enzymaktivität durch den Haplotyp (-163A)-(-739G)-(-729T) (CYP1A2\*1K). Sie vermuten die Ursache der Beeinträchtigung der Enzymfunktion in der Veränderung einer Ets-Protein-Bindungsstelle an Position -729. Für Träger des Haplotyps CYP1A2\*1J waren keine nennenswerten Effekte auf die Enzymaktivität zu erkennen. Damit bleibt die Funktionalität der -163C>A-Variante zweifelhaft. In einer japanischen Stichprobe wurde von Soyama et al. (2005) für den Diplotyp aus rs2069519 und rs762551 eine schwache Kopplung ermittelt, diese wurde jedoch nur semiquantitativ dargestellt. Ein besseres Verständnis der Kopplung zwischen einzelnen Varianten kann dazu beitragen, dass die Anzahl zu genotypisierender Polymorphismen in zukünftigen Untersuchungen reduziert wird. Es ist aber bereits auf die Spezifität dieser Angabe für ethnisch homogene Populationen hingewiesen worden (Stephens et al., 2001). Gerade zwischen asiatischen und kaukasischen Ethnien finden sich zum Teil deutliche Unterschiede in der Prävalenz von CYP1A2-Haplotypen, ethnische Unterschiede in der Enzymaktivität lassen sich damit dennoch nicht erklären (Ghotbi et al., 2007). Auch für intraethnische Variabilität der CYP1A2-Aktivität liefern Haplotypen noch keine valide Maßzahl (Jiang et al., 2006). Vieles deutet demnach darauf hin, dass CYP1A2-Haplotypen ohne die rs2069519-Variante eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen.

## 6 Zusammenfassung

Das Enzym Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus zahlreicher Medikamente und ist damit zugleich maßgeblich für viele Arzneimittelwirkungen und –nebenwirkungen. Sowohl CYP1A2-Genvarianten als auch umweltbedingte Faktoren verändern dabei auf komplexe Weise die Enzymaktivität. Die vorliegende Arbeit untersucht am Beispiel des atypischen Neuroleptikums Olanzapin den Effekt definierter polymorpher Regionen im CYP1A2-Gen und zusätzlicher klinischer Einflussgrößen auf die Pharmakokinetik.

Zunächst wurde die Prävalenz genetischer CYP1A2-Varianten in einer Stichprobe von 145 Patienten mit der Diagnose Schizophrenie (ICD-10: F20.-) geprüft, die das Pharmakon Olanzapin eingenommen hatten. Die Stichprobe setzte sich zusammen aus Patienten, die zwischen Dezember 1999 und März 2002 in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der Universität Regensburg (Bezirksklinikum) stationär oder ambulant behandelt worden waren. Zur Bestimmung der Prävalenz von zwei diallelischen Einzelbasen-Polymorphismen, rs762551 (CYP1A2\*1F) und rs2069519, sowie der CYP1A2-Mutation F21L wurden PCR-basierte Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Assays angewandt. Anschließend wurden die bei der Genotypisierung gewonnenen Prävalenzraten der untersuchten Allele in Beziehung gesetzt zu den im Vorfeld mittels HPLC gemessenen Olanzapinserumspiegeln.

Unter Berücksichtigung klinischer Parameter wie Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Komedikation wurde der Stellenwert von insgesamt neun potentiellen Einflußfaktoren auf den Serumspiegel des Pharmakons in univariaten und multivariaten Modellen ermittelt.

Zur ergänzenden Bewertung der Funktionalität der rs762551-Variante in vitro erfolgte eine transiente Transfektion dreier Zelllinien (Cos-7, HeLa und Kelly) mit beiden rs762551-Allelen. Allelspezifische Effekte wurden mittels eines Reportergen-Assays quantifiziert.

Hinsichtlich der Prävalenz der drei Genvarianten konnten vorbeschriebene Allelfrequenzen bestätigt werden. Auch die gemessenen Olanzapinspiegel lagen im Bereich früher veröffentlichter Untersuchungen. Die Auswertung der klinischen Parameter Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Komedikation auf den Serumspiegel von Olanzapin bestätigte eine statistisch signifikante Rolle der Geschlechtszugehörigkeit und des Raucherstatus auf den Serumspiegel von Olanzapin. Neu identifiziert wurde der Effekt des Polymorphismus rs2069519 auf diesen Phänotyp. Weder inhibierende bzw. induzierende Komedikation noch das Alter der Patienten nahmen einen vergleichbaren Einfluß auf die Höhe des Serumspiegels. Auf diesen Ergebnissen basierend wurden die drei identifizierten Prädiktoren des Olanzapinserumspiegels in einem Interaktionsmodell zusammengefaßt. Sie erklärten zusammengekommen über 22% der Varianz unter naturalistischen Studienbedingungen.

Die in der Vergangenheit wiederholt postulierte Bedeutung eines zweiten Polymorphismus (rs762551) für die Pharmakokinetik von Olanzapin war dagegen weder in der Regressionsanalyse erkennbar noch experimentell im Zellmodell zu bestätigen.

Für die Praxis ergeben sich hieraus wertvolle Hinweise auf die Wechselwirkung von genetischen Parametern und Umwelteinflüssen in der Modulation der Serumspiegel von Olanzapin. Im Einzelfall sollte auf eine Überwachung der therapeutischen Medikamentendosis gerade bei Frauen sowie bei Patienten, die Nikotinabusus betreiben, nicht verzichtet werden um der veränderten Enzymaktivität Rechnung zu tragen. Die Genotypisierung des Polymorphismus rs2069519 vor einer Therapie mit Olanzapin kann zusätzlich helfen individuelle Schwankungen des Medikamentenspiegels zu minimieren. Ein therapiebegleitendes "drug monitoring" wird dadurch allerdings nicht ersetzt.

## 7 Literatur

Aitchison KJ, Gonzalez FJ, Quattrochi LC, Sapone A, Zhao JH, Zaher H, Elizondo G, Bryant C, Munro J, Collier DA, Makoff AJ, Kerwin RW: Identification of novel polymorphisms in the 5'-flanking region of CYP1A2, characterization of interethnic variability, and investigation of their functional significance. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 695-704

Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Hellman K, Pitarque M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians affecting induction and expression: characterization of novel haplotypes with single nucleotide polymorphisms in intron 1. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 659-669

Allison DB, Mentore JL, Heo M, Chandler LP, Cappelleri JC, Infante MC, Weiden PJ: Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1686-96

Allorge D, Chevalier D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Suard F, Baumann P, Eap CB, Broly F: Identification of a novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 341-4.

Aravagiri M, Ames D, Wirshing WC, Marder SR: Plasma level monitoring of olanzapine in patients with schizophrenia: determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 307-13

Barnett CR, Wilson J, Wolf CR, Flatt PR, Ioannides C: Hyperinsulinemia causes a preferential increase in hepatic P4501A2 activity. *Biochem Pharmacol* 1992; 43:1255-61

Barrett JC, Fry B, Maller, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21:263-5

Bartzokis G, Altshuler L: Biological underpinnings of treatment resistance in schizophrenia: a hypothesis. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37: 5-7

Basile VS, Ozdemir V, Masellis M, Walker ML, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Alva G, Kalow W, Macciardi FM, Kennedy JL: A functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene: association with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 410-7.

Bergemann N, Frick A, Parzer P, Kopitz J: Olanzapine plasma concentration, average daily dose, and interaction with co-medication in schizophrenic patients. *Pharmacopsychiatry* 2004; 37: 63-8.

Bender R, Lange S, Ziegler A: Wichtige Signifikanztests. Artikel 11 der Statistik-Serie der DMW. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: T1-T3

Bender R, Ziegler A, Lange S: Multiple Regression. Artikel 13 der Statistik-Serie der DMW. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: T8-T10

Boke O, Gunes S, Kara N, Aker S, Sahin AR, Basar Y, Bagci H: Association of serotonin 2A receptor and lack of association of CYP1A2 gene polymorphism with tardive dyskinesia in a Turkish population. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 527-31

Bortz J, Weber R: Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 2005

Buckley PF: Olanzapine: a critical review of recent literature. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2077-89

- Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM: Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 177-93
- Chevalier D, Cauffiez C, Allorge D, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Lafitte JJ, Broly F: Five novel natural allelic variants-951A>C, 1042G>A (D348N), 1156A>T (I386F), 1217G>A (C406Y) and 1291C>T (C431Y)-of the human CYP1A2 gene in a French Caucasian population. *Hum Mutat* 2001; 17: 355-6
- Chida M, Yokoi T, Fukui T, Kinoshita M, Yokota J, Kamataki T: Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 899-902.
- Chong SA, Remington G: Plasma olanzapine and clinical response. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19: 192-4
- Chong SA, Tan EC, Tan CH, Mythily: Smoking and tardive dyskinesia: lack of involvement of the CYP1A2 gene. *J Psychiatry Neurosci* 2003; 28: 185-9
- Christiansen L, Bygum A, Jensen A, Thomsen K, Brandrup F, Hórder M, Petersen NE: Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Hum Genet* 2000; 107: 612-614
- Chue P, Singer P: A review of olanzapine-associated toxicity and fatality in overdose. *J Psychiatry Neurosci* 2003; 28: 253-261
- Croniger C, Leahy P, Reshef L, Hanson RW: C/EBP and the control of phospho-enolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 31629-31632
- Dahl ML: Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 453-70
- Desai HD, Seabolt J, Jann MW: Smoking in patients receiving psychotropic medications: a pharmacokinetic perspective. *CNS Drugs* 2001; 15: 469-94
- Ereshefsky L: Pharmacokinetics and drug interactions: Update for new antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 1996; 57 (Suppl. 11): 12-25
- Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine (2007). <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>. Version 4.0, August 2007
- Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A, Watkins PB: Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology* 1999; 117: 89-98
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P: Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Ärztebl* 2002; 99 A-3190/B-2691/C-2506
- Frick A, Kopitz J, Bergemann N: Omeprazole reduces clozapine plasma levels: A case report. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 121-3
- Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP: Therapeutic drug monitoring of olanzapine: the combined effect of age, gender, smoking, and comedication. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 46-53.
- Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L: Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 537-46

- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB: Introduction to genetic analysis. 9<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2008
- Groskreutz DJ, Sherf BA, Wood KV, Schenborn ET: Increased Expression and Convenience with the New pGL3 Luciferase Reporter Vectors. *Promega Notes Magazine* 1995; 50: 2-6
- Haen E, Dobmeier M, Melchner D, Nonnenmacher T, Klein HE: Etablierung eines Vergleichsbereiches für die Konzentrationsbestimmung von Olanzapin und Clozapin im Plasma psychiatrischer Patienten. *Abstracts zum Workshop der TDM-Arbeitsgruppe der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie, Tübingen 2000*, 35-37
- Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat* 2000; 15: 57-61
- Han XM, Ou-Yang DS, Lu PX, Jiang CH, Shu Y, Chen XP, Tan ZB, Zhou HH: Plasma caffeine metabolite ratio (17X/137X) in vivo associated with G2964A and C734A polymorphisms of human CYP1A2. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 429-35
- Han XM, Ouyang DS, Chen XP, Shu Y, Jiang CH, Tan ZR, Zhou HH: Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 540-3
- Hardy GH: Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908; 28: 49-50
- Huang JD, Guo WC, Lai MD, Guo YL, Lambert GH: Detection of a novel cytochrome p-450 1A2 polymorphism (F21L) in Chinese. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 98-101
- International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 1409; 860–921
- Ikeya K, Jaiswal AK, Owens RA, Jones JE, Nebert DW, Kimura S: Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1399-1408
- Jeppesen U, Gram LF, Vistisen K, Loft S, Poulsen HE, Brøsen K: Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 51: 73-8
- Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, von Richter O, Jin L, Nebert DW: Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 359-67
- Kapur S, Zipursky RB, Remington G: Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999; 156: 286-93
- Kelly DL, Conley RR, Tamminga CA: Differential olanzapine plasma concentrations by sex in a fixed dose study. *Schizophr Res* 1999; 40: 101-4
- Kodama M, Fujioka T, Duman RS: Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 570-80
- Lange S, Bender R: (Lineare) Regression/Korrelation. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: T33-T35

- Lange S, Bender R: Median oder Mittelwert? *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: T25-T26
- Lange S, Bender R: Variabilitätsmaße. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: T29-T30
- Lange S, Bender R: Was ist der p-Wert? *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: T39-T40
- Lange S, Bender R: Was ist ein Signifikanztest? Allgemeine Aspekte. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: T42-T44
- Lewin B: Molekularbiologie der Gene. Studienausgabe, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2002
- Liddell J: Pharmacogenetics. Cholinesterase variants and suxamethonium apnoea. *Proc R Soc Med* 1968; 61: 168–170
- Lieberman JA, Stroup TS, McEnvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RSE, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK: Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New Eng J Med* 2005; 353: 1209-1223
- Liggett SB: Pharmacogenetic applications of the Human Genome project. *Nat Med* 2001; 7: 281-3
- Lilly Pharmaceuticals: Zyprexa product monograph. *Lilly Pharmaceuticals* 1996
- Lucas RA, Gilfillan DJ, Bergström RF: A pharmacokinetic interaction between carbamazepine and olanzapine: observations on possible mechanism. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 639-43
- Lüllmann, Heinz; Mohr, Klaus; Wehling, Martin: Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen, 14. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1999
- Lurie G, Maskarinec G, Kaaks R, Stanczyk FZ, Le Marchand L: Association of genetic polymorphism with serum estrogens measured multiple times during a 2-year period in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1521-7
- Matsumoto C, Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Nakamura J: Genetic association analysis of functional polymorphisms in the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene with tardive dyskinesia in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2004; 14: 209-13.
- MacLeod SL, Tang YM, Yokoi T, Kamataki T, Dublin S, Lawson B. et al: The role of recently discovered genetic polymorphism in the regulation of the human CYP1A2 gene. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39: 396
- Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozikiewicz PM, Niewinski P, Brockmöller J, Roots I: Implications for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med* 2003; 81: 154-167
- Mülhardt, C: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 2003
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 1: 263-73
- Murayama N, Soyama A, Saito Y, Nakajima Y, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Kimura H, Goto Y, Saitoh O, Katoh M, Ohnuma T, Kawai M, Sugai K, Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Ozawa S, Sawada J: Six novel nonsynonymous CYP1A2 gene polymorphisms: catalytic activities of the naturally occurring variant enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 300-6

- Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T: Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 413-21
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W et al.: The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987; 6: 1-11
- Nordmark A, Lundgren S, Ask B, Granath F, Rane A: The effect of the CYP1A2 \*1F mutation on CYP1A2 inducibility in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 504-510
- Olesen OV, Linnet K: Olanzapine serum concentrations in psychiatric patients given standard doses: the influence of comedication. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 87-90
- Papp-Jámbor C, Jaschinski U, Forst H: Cytochrom-P450-Enzyme und ihre Bedeutung für Medikamenteninteraktionen. *Anaesthesist* 2002; 51: 2-15
- Parker AC, Pritchard P, Preston T, Choonara I: Induction of CYP1A2 activity by carbamazepine in children using the caffeine breath test. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 176-178
- Parsons WD, Neims AH: Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 24: 40-45
- Perry PJ, Lund BC, Sanger T, Beasley C: Olanzapine plasma concentrations and clinical response: acute phase results of the North American olanzapine trial. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 14-20
- Perry PJ, Argo TR, Carnahan RM, Lund BC, Holman TL, Ellingrod VL, Miller D: The association of weight gain and olanzapine plasma concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 2005; 25: 250-4
- pGL3 Luciferase Reporter Vectors, *Technical Manual Promega Corporation* 2002
- Piper M: Special report: genotyping for cytochrome P450 polymorphisms to determine drug-metabolizer status. *Technol Eval Cent Asses Program Exec Summ* 2004; 19: 1-2.
- Quattrochi LC, Tukey RH: The human cytochrome Cyp1A2 gene contains regulatory elements responsive to 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 1989 ; 36: 66-71
- Rao ML, Hiemke C, Grasmäder K, Bauman P: Olanzapin: Pharmakologie, Pharmakokinetik und Therapeutisches Drug Monitoring. *Fortschr Neurol Psychiat* 2001; 69: 510-517
- Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik RO, Brosten K: The interindividual difference in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 473-8
- Rietschel M: Pharmakogenetische Strategien. *Fortschr Neurol Psychiat* 2001; 69 Sonderheft 2: S62-S64
- Ring BJ, Catlow J, Lindsay TJ, Gillespie T, Roskos LK, Cerimele BJ, Swanson SP, Hamman MA, Wrighton SA: Identification of the human cytochromes P450 responsible for the in vitro formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 658-666
- Rosenheck R, Perlick D, Bingham S, Liu-Mares W, Collins J, Warren S, Leslie D, Allan E, Campbell EC, Caroff S, Corwin J, Davis L, Douyon R, Dunn L, Evans D, Frecska E,



Grabowski, MD; David Graeber, MD; Lawrence Herz, MD; Kong Kwon, MD; William Lawson J, Mena F, Sheikh J, Smelson D, Smith-Gamble V: Effectiveness and Cost of Olanzapine and Haloperidol in the Treatment of Schizophrenia. *JAMA* 2003; 290: 2693-2702

Rozen S, Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Hrsg.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, USA, 2000

Sachse C, Bhambra U, Smith Gillian, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, the colorectal cancer study group: Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 68-76

Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I: Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 445-449

Saito Y, Hanioka N, Maekawa K, Isobe T, Tsuneto Y, Nakamura R, Soyama A, Ozawa S, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S, Sawada J: Functional analysis of three CYP1A2 variants found in a Japanese population. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1905-10

Sathirakul K, Chan C, Teng L, Bergström RF, Yeo KP, Wise SD: Olanzapine pharmacokinetics are similar in Chinese and Caucasian subjects. *Br J Pharmacol* 2003; 56: 184-187

Schulze TG, Schumacher J, Müller DJ, Krauss H, Alfter D, Maroldt A, Ahle G, Maroldt AO, Novo y Fernández A, Weber T, Held T, Propping P, Maier W, Nöthen MM, Rietschel M: Lack of association between a functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Am J Med Genet* 2001; 105: 498-501

Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV: Dual-Luciferase™ reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *renilla* luciferase assays. *Promega Notes Magazine* 1996; 57: 2-7

Shimoda K, Someya T, Morita S, Hirokane G, Yokono A, Takahashi S, Okawa M: Lack of impact of CYP1A2 genetic polymorphism (C/A polymorphism at position 734 in intron 1 and G/A polymorphism at position -2964 in the 5'-flanking region of CYP1A2) on the plasma concentration of haloperidol in smoking male Japanese with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 261-5

Skogh E, Reis M, Dahl ML, Lundmark J, Bengtsson F: Therapeutic drug monitoring data on olanzapine and its N-demethyl metabolite in the naturalistic clinical setting. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 518-26

Slaughter RL, Edwards DJ: Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacother*. 1995 ;29: 619-24

Smoller JW: Incorporating pharmacogenetics into clinical practice: reality of a new tool in psychiatry. Practical issues related to medication selection. *CNS Spectr* 2006; 11: 5-7

Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, Ihrle P, Mehall JM, Edwards TL, Dawson EP: Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 895-931

Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Maekawa K, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Saitoh O, Kawai M, Ohnuma T,

- Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J: Single nucleotide polymorphisms and haplotypes of CYP1A2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 24-33
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF: Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001; 293: 489-93
- Stern C: The Hardy-Weinberg law. *Science* 1943; 97: 137-138
- Timmermann B, Sauer S, Dahl A, Reinhard R: Genetische Variabilität des Menschen: Hochdurchsatz-Technologien und Datenanalyse. *Laborwelt* 2004 5:31-32
- Tiwari AK, Deshpande SN, Lerer B, Nimgaonkar VL, Thelma BK: Genetic susceptibility to Tardive Dyskinesia in chronic schizophrenia subjects: V. Association of CYP1A2 1545 C>T polymorphism. *Pharmacogenomics J* 2007; 7: 305-11
- TOPO TA Cloning® Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products. *Invitrogen Corporation*, 2004
- Ueda R, Iketaki H, Nagata K, Kimura S, Gonzalez FJ, Kusano K, Yoshimura T, Yamazoe Y: A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1924-30
- Wakade CG, Mahadik SP, Waller JL, Chiu FC: Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res* 2002; 69: 72-9
- Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik, 3.Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005
- Weiss U, Marksteiner J, Kemmler G, Saria A, Aichhorn W: Effects of age and sex on olanzapine plasma concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 2005; 25: 570-4
- Welfare MR, Aitkin M, Bassendine MF, Daly AK. Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 367-75
- Wood KV: The chemistry of bioluminescent reporter assays. *Promega Notes* 1998; 65: 14-20
- Xue L, Crookham SB, Diamond FX, Davis PJ, Reiber TM: Development of a gas chromatographic method for the determination of olanzapine in human serum, and a report of patient values. *Clin Chem* 1998; 44: A103
- Zhou H, Joseph PD, Kim D, Guengerich FP: Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. *Arch Biochem Biophys* 2004; 422: 23-30
- Zubay GL: Biochemie. Übersetzung der 4. Auflage. Brandt U, Schägger H (Hrsg.) McGraw-Hill International (UK) Ltd., 2000

## 8 Appendix

Die Berechnungen für die vorliegende Arbeit wurden auf einem Compaq Presario Notebook, Betriebssystem Windows NT und einem Asus Z Notebook, Betriebssystem Windows XP verfasst.

### 8.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

#### 8.1.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genvarianten und assoziierte Phänotypen des Cytochrom-P450-1A2-Gens.....	4
Tabelle 2: Patientenmerkmale .....	11
Tabelle 3: Primersequenzen .....	13
Tabelle 4: Standard-PCR-Ansatz .....	13
Tabelle 5: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau .....	14
Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen.....	15
Tabelle 7: Fragmentgrößen (bp) der durchgeführten CYP1A2-RFLP-Assays .....	15
Tabelle 8: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau der Spender-DNA.....	20
Tabelle 9: Ansätze der Stocklösungen .....	22
Tabelle 10: Ansätze der Transfektionslösungen .....	22
Tabelle 11: Schema der Zellstimulation.....	23
Tabelle 12: Variablen und ihre Ausprägung .....	26
Tabelle 13: „dummy“-Variablen für den CYP1A2*1F-Polymorphismus .....	26
Tabelle 14: „dummy“-Variablen für den rs2069519-Polymorphismus .....	26
Tabelle 15: Von den Patienten zusätzlich zu Olanzapin eingenommene Medikation .....	35
Tabelle 16: Überblick der den Berechnungen zugrunde liegenden statistischen Modelle .....	42

#### 8.1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hydroxylierung eines Substrats durch das Cytochrom P450.....	2
Abbildung 2: Übersicht zum Olanzapinmetabolismus.....	7
Abbildung 3: Standard-PCR-Profil .....	13
Abbildung 4: PCR-Profil für den Nachweis von rs2069519.....	14
Abbildung 5: Klonierung von Taq-amplifizierter DNA mit der TOPO TA-Methode.....	17
Abbildung 6: pCR®2.1TOPO®-Vektor der Firma Invitrogen .....	18
Abbildung 7: pGL3-Enhancer-Vektor .....	19
Abbildung 8: pGL3-Control-Vektor .....	22
Abbildung 9: Olanzapinserumkonzentration in Relation zur täglich verabreichten Dosis und Referenzbereich nach Rao et al. (2001) .....	27
Abbildung 10: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel der einzelnen Teilkollektive im Vergleich .....	28
Abbildung 11: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Frauen (N=63) und Männern (N=82) im Vergleich (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler) .....	29
Abbildung 12: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Patienten bis einschließlich 59 Jahre (N=131) und der Patienten ab 60 Jahren (N=14) im Vergleich (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler) .....	30
Abbildung 13: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel von Nichtrauchern (N= 79) und Rauchern (N=51) im Vergleich (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler).....	31
Abbildung 14: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel bei Patienten ohne (N= 8) bzw. mit (N=118) unerwünschten Arzneimittelwirkungen im Vergleich (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler) .....	32

Abbildung 15: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel bei Patienten mit und ohne induzierende Komedikation (N=7 bzw. N= 138) (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler)	33
Abbildung 16: dosiskorrigierte Olanzapinserumspiegel bei Patienten mit und ohne inhibierende Komedikation (N=15 bzw. N= 130) (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler)	34
Abbildung 17: Agarose-Gel-Elektrophorese des <i>Mbo</i> II-Verdaus. Das Bild zeigt exemplarisch den Genotyp CC bei 13 Patienten und den Größenstandard (Spur 1).....	36
Abbildung 18: Agarose-Gel-Elektrophorese des <i>Bsu</i> RI-Verdaus. Das Bild zeigt exemplarisch die Genotypen AA (Spur 2 und 9), AC (Spur 3, 5, 6 und 7) und CC (Spur 4 und 8) sowie den Größenstandard (Spur 1) .....	36
Abbildung 19: dosiskorrigierter Olanzapinserumspiegel bei Trägern des Wildtyp-Allels (N=61) und Trägern des C-Allels (N=84) im Vergleich (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler) .....	38
Abbildung 20: Vergleich der relativen Luziferaseaktivität bei nicht-stimulierten und mit PMA stimulierten Zellen, die das Allel A bzw. C exprimieren, differenziert nach Zelllinien .....	39
Abbildung 21: Agarose-Gel-Elektrophorese des <i>Dde</i> I-Verdaus. Das Bild zeigt neben dem Größenstandard (Spur 1) exemplarisch die Genotypen GG (Spuren 2-4, 6-13) und GT (Spur 4) .....	39
Abbildung 22: Serumspiegel bei Trägern der Genotypen GG (N=139) bzw. GT (N=6) (rs2069519-Polymorphismus).....	40
Abbildung 23: schematische Darstellung der physikalischen Entfernung zwischen den 3 untersuchten CYP1A2-Varianten sowie eines Maßes der Kopplung zwischen den beiden Varianten rs2069519 und rs762551 .....	43

## 8.2 Verwendete Materialien und Geräte

### 8.2.1 Verbrauchsmittel

Die Primer wurden bezogen von MWG Biotech, Ebersberg.

100bp-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 10xLigasepuffer (Promega Corporation, Madison, USA)  
 1kb-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 Agar (I.C.N. Pharmaceuticals, Bryan, USA)  
 Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)  
 Ampicillin (ratiopharm GmbH, Ulm)  
 Aqua dest. (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München)  
*Bsu*RI und Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
*Dde*I und Puffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main)  
 D-MEM (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
 DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)  
 dNTP (Bioline GmbH, Luckenwalde)  
 EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)  
 E-MEM mit Earle's BSS (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
 Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)  
 Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt)  
 Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)  
 FCS 10% (GIBCO BRL, Eggenstein)  
 Fugene ® (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)  
 Glucose (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

Glycerin (Merck KGaA, Darmstadt)  
 Hefeextrakt (Bacto™yeast, Becton, Dickinson&Co, Franklin Lakes, USA)  
*Hind*III (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 KCl (Merck KGaA, Darmstadt)  
 Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 L-Glutamin (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
*Mbo*II und Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 MgCl<sub>2</sub> (ABgene, Hamburg )  
 MgCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt)  
 NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)  
 NaOH (Merck KGaA, Darmstadt)  
 Na-Pyruvat (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
 NEAA (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
 Panserin (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach)  
 PBS (GIBCO BRL, Eggenstein)  
 Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)  
 pGL3-Control-Vektor (Promega Corporation, Madison, USA)  
 pGL3-Enhancer-Vektor (Promega Corporation, Madison, USA)  
 pHRG-TK-Vektor (Promega Corporation, Madison, USA)  
 PMA (Fluka Biochem, Seelze)  
 pUC19 DNA/*Msp*I-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 Puffer R+ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 Reddy Mix <sup>TM</sup> PCR Buffer IV (ABgene, Hamburg)  
 T4 DNA Ligase (Promega Corporation, Madison, USA)  
 TAE-Puffer (Millipore Corporate, Billerica, USA)  
 Taq-Polymerase (Protokoll Biotechniques 19 : 780-784 1995)  
 Tris (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)  
 Tris HCL (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)  
 Trypan-Blau (Biochrom AG, Berlin)  
 Trypsin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)  
 Trypton (Bacto™tryptone, Becton, Dickinson&Co, Franklin Lakes, USA)  
*Xho*I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

### 8.2.2 Lösungen

5 x TE-Puffer pH 8,0

50 mM Tris/HCl

5 mM EDTA

10xPuffer rot für PCR

Reddy Mix <sup>TM</sup> PCR Buffer IV

150 µl 0,1 M MgCl<sub>2</sub>

1xTAE-Puffer

20 ml 50xTAE-Puffer

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### 8.2.5 Medien

Agarose-Gel 2% und 4%

Nu-Sieve 3:1 Agarose

1xTAE-Puffer

Ethidiumbromid 10mg/ml

Cos-7- und Kelly-Medium

500 ml D-MEM

50 ml FCS 10%

11,2 ml L-Glutamin

5,5 ml Penicillin/Streptomycin

HeLa-Medium

500 ml E-MEM mit Earle's BSS

5 ml Na-Pyruvat

0,5 ml NEAA

5,6 ml L-Glutamin

5,5 ml Penicillin/Streptomycin

50 ml FCS 10%

LBamp-Agar

LB-Medium (s.u.)

1,5% (w/v) Agar

1 µl Ampicillin / ml Agar

LBamp-Medium

LB-Medium (s.u.)

1 µl Ampicillin /ml LB-Medium

LB-Medium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

ad pH 7,5 NaOH

SOC-Medium

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml 0,25M KCl

5 ml 2 M MgCl<sub>2</sub>

20 ml 1 M Glucose

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

ad pH 7,0 NaOH

### 8.2.8 gebrauchsfertige Reaktionskits

Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega Corporation, Madison, USA)

FastPlasmidMiniKit (Eppendorf, Hamburg)

QIAamp DNA Blood Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen, Düsseldorf)

QIAQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Düsseldorf)  
Topo TA Cloning ® Kit (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)

### **8.2.3 Bakterien**

E.coli K-12-Stamm DH10B aus Topo TA Cloning ® Kit (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)

### **8.2.4 Eukaryontische Zellen**

(alle Zellen wurden bezogen vom Institut für angewandte Zellkultur, München)  
Cos-7 (Fibroblasten Cercopithecus aethiops)  
HeLa (humanes Cervix-Karzinom)  
Kelly (humanes Neuroblastom)

### **8.2.7 Reaktionsgefäße**

0,2 ml 8er SoftStrips® (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)  
0,5ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)  
2 ml Reaktionsgefäße 3810 (Eppendorf, Hamburg)  
75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (BD Falcon <sup>TM</sup>, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)  
96-well-Zellkulturplatten Nunclon<sup>TM</sup>Δ Surface (Nunc Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark)  
Petri-Schalen (BD Falcon <sup>TM</sup>, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)  
Reagenzgläser (Nunc Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark)  
TubePlates® 96 SoftTubes® (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)

### **8.2.6 Geräte**

Agarosegelelektrophoresekammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)  
CO<sub>2</sub>-Schränk Heracell (Heraeus, Hanau)  
Luminometer Lucy 1 (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld)  
Photometer GeneQuant II, (PharmaciaBiotech, Freiburg)  
Pipettierroboter (Corbett Robotics, San Francisco, USA)  
Probenschüttler IKA-VIBRAX-VXR (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen)  
Spannungsquelle (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen)Anthos®  
Sterilbank Herasafe (Heraeus, Hanau)  
Thermocycler Genius (Techne Inc., Burlington, USA)  
Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)  
Videodokumentationssystem Gelprint 2000i (Biophotonics, Ann Arbor, USA)  
Vortexer Reax2000 (Heidolph, Schwabach)  
Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus, Hanau)  
Zentrifuge Megafuge 2.0R (Heraeus, Hanau)

### **8.2.9 Software**

GeneTool lite®, Version 2.0 (BioTools Inc., Edmonton, Kanada)  
Haploview Version 3.32 bzw. Version 4.1 (Broad Institute, Cambridge, USA, 2006)  
Online-Prüfung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium  
([http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/\\_Popgen/genetik/applets/kitest.htm](http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm))  
Primer3 (Whitehead Institute, Cambridge, USA)  
PRISM 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)  
SPSS Version 12.0 bzw. Version 16.0 (SPSS Inc. Chicago, USA)

## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Dissertation habe ich an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Regensburg angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Klein dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie anzufertigen

Herrn Prof. Dr. Hajak für die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas

Herrn PD Dr. Dobmeier für die Sammlung und freundliche Überlassung der Patientendaten

Herrn Dr. Sand für die unmittelbare Betreuung im Labor, seine Geduld und die kritische Korrektur der Rohfassung

Herrn Kummer für die Hilfe im Archiv der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie

Dem gesamten Laborteam, vor allem Frau Petra Stoertebecker für die Unterstützung bei unlösbar erscheinenden Problemen in der Laborarbeit.



## **LEBENS LAUF**

### **PERSÖNLICHE DATEN:**

Vera Wechsung

Geboren am 27.08.1980 in Lauf an der Pegnitz

Familienstand: ledig

### **SCHULBILDUNG:**

1986 - 1990    Grundschule St. Kunigund Lauf

1990 - 1999    Melanchthon-Gymnasium Nürnberg

### **HOCHSCHULBILDUNG:**

2000 - 2003    Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg

März 2002    Ärztliche Vorprüfung

März 2003    Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2003 - 2006    Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

März 2005    Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2006    Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **BERUFSTÄTIGKEIT:**

2007 - 07/2009    Assistenzärztin der Klinik für Kinder und Jugendliche,  
Klinikum St. Marien, Amberg

Seit 08/2009    Assistenzärztin der Abteilung für Kinderchirurgie,  
Klinikum Nürnberg Süd